

Untersuchungen über die
Konservierung von Hundesperma

Eberhard Bahlau

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE KONSERVIERUNG

VON HUNDESPERMA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Eberhard B a h l a u
aus Posen

München 1958



Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. med. Karl Zipf

Referent: Prof. Dr. med.vet. Walther Baier

Tag der Promotion: 26. Februar 1958

UNI - DRUCK, MÜNCHEN 13, AMALIENSTR. 85

E I N L E I T U N G

Die künstliche Besamung beim Hunde begegnet besonderen Schwierigkeiten, die in den biologischen Gegebenheiten des Hundeejakulates begründet sind, und die sich stark auf die Konservierung des Hundespermas auswirken.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit den Möglichkeiten, das Leben der Spermien zu erhalten.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	
Die Gewinnung und Untersuchung von Hundesperma	1
Allgemeines und Literatur	1
Eigene Versuche	5
Die Konservierung von Spermien unter besonderer Berücksichtigung ihrer Physiologie	13
Die Konservierung von Hundesperma mit Hilfe von Puffern	18
Literatur	18
Eigene Versuche	21
Überblick	34
Die Glyzerinverträglichkeit beim Hundesperma	39
Literatur	39
Eigene Versuche	40
Folgerungen aus den Versuchen zur Glyzerinverträglichkeit	43
Die Tiefkühlung von Hundesperma	44
Literatur	44
Eigene Versuche	44
Überblick über die Tiefkühlversuche	53
Die Anreicherung des Puffers mit Kohlendioxyd	54
Allgemeines und Literatur	54
Eigene Versuche	55
Überblick über die Versuche mit CO ₂ -Anreicherung	58
Rückblick auf das gesamte Arbeitsgebiet	59
Zusammenfassung	62
Literaturverzeichnis	63



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DIE GEWINNUNG UND UNTERSUCHUNG VON HUNDESPERMA

Allgemeines und Literatur

Die künstliche Besamung wurde beim Hund vom wirtschaftlichen oder züchterischen Standpunkt wenig gefordert. Das war bisher so, obwohl die wissenschaftliche Forschung auf diesem Gebiet nach unserer Kenntnis bei Versuchen am Hund einsetzte. Inzwischen hat die künstliche Besamung vor allem beim Rind eine erhebliche Bedeutung erlangt, ungeachtet dessen, daß die Diskussion um die künstliche Besamung an sich noch lange nicht schweigen wird, ginge sie nun um ihre Berechtigung materieller oder ideeller Art. Daß die künstliche Besamung beim Rind eine so große Verbreitung gefunden hat und bei anderen Haustieren möglicherweise noch finden wird, dankt sie sicher wirtschaftlichen Gründen, mögen diese nun vom züchterischen oder hygienischen Standpunkt her vertreten werden. Dem kommt entgegen, daß die biologischen Gegebenheiten im Ejakulat des Rindes für das Vorhaben der künstlichen Besamung günstiger sind. Bei Pferd, Schwein und Hund ergeben sich für die Konservierung des Spermas bedeutende Schwierigkeiten schon aus der Zusammensetzung des mehrphasischen Ejakulates. Es war Lazzaro Spallancani, Abt von Pavia, der in den achtziger Jahren des achtzehnten Jahrhunderts die künstliche Besamung bei einer Hündin erstmalig mit Erfolg durchführte. Hundert Jahre später zeigte man Interesse an der künstlichen Besamung des Pferdes vor allem in Amerika und Rußland. I w a n o f f versuchte mit der Schwammethode zum Ziele zu kommen, indem er anläßlich eines natürlichen Deckaktes versuchte, das Ejakulat mittels eines vorher in die Scheide eingeführten Schwammes zu gewinnen. Aufbauend auf die Versuche und Berichte von R o e m m e l e und A m a n t e a kamen dann im Jahre 1930 M i l o w a n o f f, Kusnezowa, Nagajeff und F i l i p o f f zu Ergebnissen, die unseren heutigen Verfahren nahekommen.

Das Experimentieren mit Samengewinnung und Samenübertragung führte zwangsläufig zu dem naheliegenden Problem der Erhaltung des Lebens von befruchtungsfähigen Spermien über einen längeren Zeitabschnitt hinweg. Es mußten also zunächst die Lebensvorgänge im Ejakulat, im Sperma und des Spermiums geklärt werden. Beim Hunde waren es die Arbeiten von Alifanow, Freiberg, Lambert und Mc Kenzie, Peters, Hancock, Rowlands,

Mooder, die zu Erkenntnissen über das Ejakulat und seine Fraktionen, über das Sperma, über dessen Menge, Beweglichkeit, Lebensdauer und p_H führten. Diese Arbeiten, die sich mit der Physiologie der Hundespermien befaßten, und die Arbeiten und Erfahrungen in der künstlichen Besamung überhaupt, die sich mit Verdünnern, Puffern, ernährenden Substanzen, Temperaturen und dergleichen beschäftigten, bildeten dann die Basis für Konservierungsversuche mit Hundesperma, wie sie von Milowanoff, Slomkowski und von Brochard-Coulomb durchgeführt wurden, und wie sie Biedermann beschreibt. Harrop hatte Erfolge mit milchverdünntem Sperma sogar nach Verschickung desselben von England nach USA und in Zusammenarbeit mit Leonard dortselbst.

Die Methoden der Samengewinnung beim Hunde sind denen bei anderen Tierarten vergleichbar. Sie haben jedoch Rücksicht zu nehmen auf die Eigenarten des Ejakulationsvorganges beim Hunde. Der Hund ist Uterusbesamer. Sein Ejakulat zeichnet sich, wie das von Pferd und Schwein, durch große Mengen von Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen aus. Da die Sekrete zwar aktivierend auf die Spermien wirken, deren Lebenszeit aber gleichzeitig verkürzen, muß man bestrebt sein, diese Beimengungen zu vermeiden. Dem kommt entgegen, daß die Ejakulation beim Rüden dreiphasisch verläuft, und daß die Phasen zeitlich hinreichend voneinander abgesetzt sind, um eine fraktionierte Gewinnung zu ermöglichen. Diese fraktionierte Gewinnung ist gut möglich, indem man den Rüden durch Massage des Penis zur Ejakulation bringt. Wichtig ist dabei die Reinigung nicht nur des Präputiums, sondern auch des Bauches, um - besonders bei langhaarigen Tieren - Verschmutzungen vorzubeugen. Die Massage beginnt mit leichtem Streichen des Penis bis zur Vorerektion und geht dann in kräftigere Friktionsbewegungen über, die der Hund in den meisten Fällen mitmacht. Auch wird häufig der Umklammerungsreflex ausgelöst; die Eichel schwillt stark an. Während eine Hand also die Massage ausführt, hält die andere ein geeignetes Auffanggefäß. Da das Ejakulat in den meisten Fällen hervorspritzt, gehört neben einem Gefäß mit großer Öffnung auch einige Geschicklichkeit zum Auffangen des Spermas hinzu. Das Samenauffanggefäß wird dann je nach Bedarf zwecks fraktionierter Gewinnung des Ejakulats ausgewechselt. Die drei Phasen sind während der Ejakulation schon dank ihrer verschiedenen Färbung deutlich voneinander zu unterscheiden. Die Zeitspanne vom Beginn der Massage an bis zur Ejakulation ist je nach Libido des Rüden verschieden lang. Der Ablauf kann in einer Minute vorsichgehen, mitunter aber erst nach zehn Minuten

und mehr. Die leichte Massage des Schwellkörpers etwas kaudal der Eichel wird als die beste Methode empfohlen. Die Vorteile der Spermagewinnung durch Massage sind darin zu sehen, daß ohne Instrumente eine meistens saubere und fraktionierte Gewinnung möglich ist. Nachteilig wirkt die Gefahr der Verschmutzung bei besonders temperamentvollen Hunden. Der Erfolg der Massage ist sehr abhängig von der Libido und daher oft nicht reproduzierbar.

Die Verwendung einer künstlichen Scheide ist ein anderer der beim Hunde möglichen Wege, den ja auch *A m a n t e a* beschritten hatte und nach ihm *Bonadonna*. *Biedermann* (1) benutzte die Schafscheide nach *Götze*. Die Innentemperatur betrug bei seinen Versuchen in der künstlichen Scheide 40,5 - 42°C. Nachdem die Vorerektion durch Massage bewirkt war, wurde die Scheide aufgesetzt. Der Rüde führte dann Friktionsbewegungen aus. Eventuell müssen diese Bewegungen mit der künstlichen Scheide gemacht werden, so daß gleichsam eine modifizierte Massage zustande kommt. Nach *Biedermann* ist eine fraktionierte Samengewinnung mit der künstlichen Vagina nicht möglich. *Harrop* (10) benutzt zur Spermagewinnung eine von ihm entwickelte künstliche Scheide. Er zieht die Verwendung dieses Instrumentes der Masturbation vor, weil nach seinen Erfahrungen die Ausbeute dabei größer sei. Da auch bei Gebrauch der künstlichen Vagina, wie sie für Rinder und Schafe üblich ist, nach einigen Absamungen leicht Libidomangel eintritt, hat er das Gerät mit einem Pulsator versehen. Dieser liegt zwischen Innenschlauch und Mantelrohr im wassergefüllten Raum, mit der Aussenwelt durch ein Zweiwegeventil verbunden. In diesen Pulsator hinein wird Luft gedrückt. Als Pumpe dient ein Gummiballgebläse.

Durch den Pulsator wird eine weitgehende Anpassung der künstlichen Vagina an den Penis erreicht. Zum anderen wird eine Art Massage bewirkt. Das Samenauffangglas wird mittels eines Hartgummiringes befestigt, der in das Mantelrohr eingeschoben wird. Nach Vorbereitung der Scheide und nachdem der Penis durch leichte Massage zur Erektion gebracht wurde, muß er schnell eingeleitet werden. In diesem Stadium erfolgt noch keine Ejakulation. Der Penis wird mit zwei Fingern hinter der geschwellenen Glans fixiert, die Vagina in der anderen Hand gehalten. Ein Helfer muß gleichzeitig den Pulsator bedienen. Bei fraktionierter Gewinnung bleibt genügend Zeit für das Auswechseln der Auffanggläser zwischen den einzelnen Ejakulationsphasen. Der Vorteil der Spermagewinnung mit der künstlichen Vagina liegt in der Sauberkeit begründet und in der Möglichkeit, eine exakte fraktionierte Gewinnung durchzuführen.

Wie schon erwähnt, läßt sich die Ejakulation beim Rüden in drei Phasen einteilen: die erste oder auch Vorphase, die zweite Phase oder auch erste Hauptphase und die dritte Phase oder auch zweite Hauptphase. Diese Phasen, die zunächst einmal rein zeitliche Begriffe darstellen, weisen auch bestandteilsmäßige Unterschiede auf, die die vorher schon angeführte fraktionierte Gewinnung angezeigt erscheinen lassen. Die drei Phasen unterscheiden sich in mancher Hinsicht, so auch in ihrer Dauer: (H a r r o p (10, 11)) .

Dauer der Vorphase: 30 - 50 Sekunden.

Dauer der 1. Hauptphase: 50 - 80 Sekunden.

Dauer der 2. Hauptphase: 3 - 30 Minuten.

Weitere Differenzen bestehen in den Mengen. Die Vorphase liefert einige Tropfen bis etwa 2 ml, die erste Hauptphase 1 - 3 ml, die zweite Hauptphase 3 - 20 ml. Rein anteilmäßig überwiegt also die dritte Fraktion. Während nun Vorphase und zweite Hauptphase die Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen enthalten, ist das Sperma der ersten Hauptphase oder mit anderen Worten der zweiten Fraktion das an sich spermienhaltige. Die Vorphase erbringt Urethraldrüsensekret, die dritte Fraktion das der Prostata. Beide enthalten nur vereinzelt Spermien.

Die Dichte beträgt nach T r a n t m a n n (28) im Gesamtejakulat 60 000/cm bzw. 60 Millionen im Ejakulat. Nach G r i z e (7) beträgt die Dichte 50 000 bis 200 000/cmm bzw. 0,5 bis 1,5 Milliarden im Ejakulat. A l i f a n o w (zit. nach H a r r o p (11)) sah Unterschiede in Menge und Dichte des Spermas, die er in Beziehung zu unterschiedlicher Libido brachte. Seine Beobachtungen lassen darauf schließen, daß der normale Spermaverlust infolge Ejakulation nach 24 bis 72 Stunden wieder ausgeglichen ist. P e t e r s (zit. nach H a r r o p (11)) fand keine Relation zwischen Dichte und Menge des Spermas.

Die erste Hauptphase ist undurchsichtig und ihrem Aussehen nach milchig. Sie enthält die Spermien, die in ihr auch Massenbewegung zeigen. Massenbewegung ist nur in dichtem Sperma stark. Durch Verdünnung ist sie aufhebbar. Eine solche Verdünnung geht durch die Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen auch im Gesamtejakulat vor sich. Die Vorwärtsbewegung der einzelnen Spermien kann durch äussere Einflüsse bis zur Ortsbewegung vermindert

werden und endlich zum Stillstand kommen. Wurde das anscheinend im Verbindungsstück des Spermiums befindliche Bewegungszentrum nicht geschädigt, so ist eine Wiedererlangung der Beweglichkeit bei Beseitigung der Schädlichkeit möglich. Alle nicht gradlinig verlaufenden Bewegungen, also auch Kreisbewegungen, sind als krankhaft anzusehen. Die Massenbewegung war bei Biedermann (1) in 62 % der Fälle kräftig, in 36 % sehr kräftig und in 2 % schwach. Im Durchschnitt waren 9,2 % der Spermien tot, 16,5 % zeigten Ortsbewegung und 74,3 % Vorwärtsbewegung.

Nach Götz (7) lebt unverdünntes Hundesperma 5 bis 7 Stunden lang. Seine Lebensdauer könne durch langsame Abkühlung auf $+4^{\circ}\text{C}$ nur unwesentlich verlängert werden. Biedermann gab eine absolute Lebensdauer von 24 Stunden in wenigen Fällen an. Bederke (zit. nach Harrop (11)) gibt die Lebensdauer normaler Spermien mit etwa 21 Stunden an und zwar für Spermien des Gesamtejakulates, während die der zweiten Fraktion länger leben sollen.

Die Fraktionen unterscheiden sich schließlich noch in ihren pH -Werten. Die Reaktion im Gesamtejakulat liegt nach Harrop (11) unmittelbar nach der Samengewinnung bei pH 5,8 bis 6,9. Später steigt die Azidität. Die einzelnen Fraktionen unterscheiden sich in ihren pH -Werten wie folgt:

Vorphase:	pH 6,37
1. Hauptphase:	pH 6,10
2. Hauptphase:	pH 7,20.

Eigene Versuche

Zur Spermagewinnung wurde grundsätzlich eine künstliche, mit Pulsator versehene Scheide verwandt. Der Raum zwischen Aussenrohr und Innenschlauch des Instrumentes wurde teilweise mit Wasser von einer Temperatur von 50°C bis 60°C gefüllt, also nicht völlig ausgefüllt, sondern nur zu reichlich einem Drittel. Zum Gebrauch der Scheide muß die Temperatur im Innern 41°C betragen. Durch den Pulsator wurde es möglich, mittels Einblasen von Luft den Innenraum der Vagina nach Bedarf zu verkleinern und auf den eingeführten Penis einen Druck auszuüben.

Die zur Spermagewinnung erforderlichen Maßnahmen hatten nicht nur die Libido des betreffenden Hundes zu berücksichtigen, sondern ebenso seine Sensi-

bilität, sein ganzes Verhalten überhaupt. Alle Hunde nahmen die künstliche Scheide an, allerdings meistens nicht schon bei der ersten Samenentnahme, die dann durch Massage ausgeführt wurde. Bei Hunden mit starker Libido war die Anwendung der künstlichen Scheide in der Regel kein Problem; sie nahmen sie gut an, wenn die Temperatur von 41°C eingehalten wurde, und sie vorher Gelegenheit gehabt hatten, das Instrument zu sehen. Andernfalls erschrecken sie leicht. Manche sehr ängstliche Hunde, die, am ganzen Leibe zitternd, auch zur Samenentnahme per Massage nicht zu verwenden waren, zeigten eine ausgesprochen starke Libido und verloren ihre Scheu gänzlich, sobald andere Hunde in ihrer Nahe angebunden wurden. Das Absamen aber wurde in jedem Falle erleichtert durch die Anwesenheit einer Hündin, auch wenn diese nicht läufig war. Es erfolgte deshalb schließlich immer die Samenentnahme im Beisein einer Hündin.

Es ist unerlässlich, die Technik der Spermaentnahme der Mentalität und dem Temperament des einzelnen Rüden anzupassen. In diesem Sinne wäre es unzutreffend, von einer festen Methode zu sprechen. Genaue Beobachtung des Tieres ist notwendig. Das Läuten der Hausglocke, Schritte vor der Tür können das Tier derartig ablenken, daß der vollerigierte Penis schlagartig abschwilt.

Folgendes ist immer zu beachten:

Es muß gelingen, den Rüden auf den Vorgang zu konzentrieren. Er darf keine Angst haben. Ruhige Bewegungen und ebenso ruhiges Sprechen sind notwendig. Der Hund soll sich den Raum und die künstliche Vagina ansehen können, ein anderer Hund, möglichst eine Hündin, soll anwesend sein. Störungen von aussen sind auszuschalten. Es ist zweckmäßig, wenn auch schwieriger, alles allein zu machen, als einen Gehilfen zu haben, der ungeschickt ist, sich hastig bewegt oder gern spricht. Die Vorerektion läßt sich durch Massage herbeiführen. Sie kommt oft schon bei der trockenen Reinigung des Praeputiums zustande. Die Innentemperatur der künstlichen Scheide soll 41°C betragen. Schwierig war es mitunter, das Ejakulat fraktioniert zu gewinnen. Die fraktionierte Gewinnung erwies sich wegen des hohen Gehaltes an Sekreten der akzessorischen Geschlechtsdrüsen im Gesamtejakulat als notwendig. In der Literatur (H a r r o p (11)) ist zwar angegeben, welche Zeit die einzelnen Ejakulationsphasen benötigen, doch können bei einem temperamentvollen Rüden, der starke Friktionsbewegungen ausführt und auch sonst recht stürmisch ist, diese Phasen nicht mit der notwendigen Genauigkeit zeitlich definiert werden. Deshalb erwies es sich als notwendig, das Samenauffanggläschen so an der

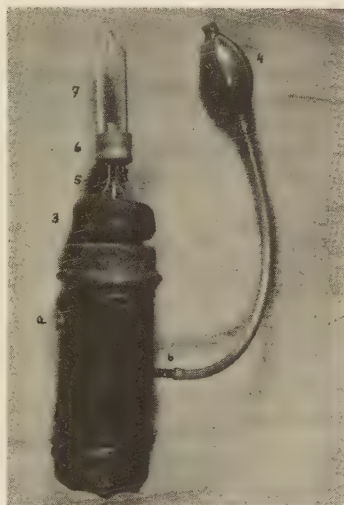
Scheide anzubringen, daß es leicht herausgenommen bzw. ausgewechselt werden konnte. In die Ausstülpung des Innenschlauches wurde deshalb nicht, wie es zum Beispiel an der künstlichen Vagina für Rinder üblich ist, ein Samenauffangglas eingeschoben und dort befestigt, sondern die Auffangvorrichtung mußte abgeändert werden. Zu diesem Zwecke wurde ein kleiner Glastrichter in den Innenschlauch eingeschoben, dessen Hals durch einen Gummistopfen lief, der seinerseits das Auffanggläschen hielt. Durch diesen Stopfen wurde eine Kanüle gebohrt, damit die Luft aus dem Glase entweichen konnte.

Das Ejakulat der Vorphase tropfte oft schon ab, bevor der Penis in die Vagina eingeführt worden war, oder es erschien während der Friktionsbewegungen im Auffangglas. Zeigte sich nun die zweite Fraktion - erste Hauptphase - im Glase, so war sie eindeutig an ihrem undurchsichtigen, milchig wolkigen Aussehen zu erkennen, denn die folgende dritte Fraktion ist klar. Das Auffangglas wurde also entfernt, sobald sich das dichte Sperma der ersten Hauptphase darin befand, und zwar ist es sicher besser, einen Teil der Spermien durch etwas vorzeitiges Entfernen des Glases zu verlieren, als die dritte Fraktion mit aufzufangen, die, da dünnflüssig, sehr schnell hinzutritt. Diese Dünnflüssigkeit war auch bisweilen der Anlaß dazu, daß das Prostatasekret, welches ja die dritte Phase ausmacht, eher im Auffangglas erschien, als das dichte und dickflüssigere Sperma, das am Gummi des Innenschlauches sich langsamer bewegt, wenn es das Glas nicht direkt erreicht hat. In solchen Fällen wurde das Glas sofort gewechselt, um das später abtropfende Ejakulat der zweiten Phase auffangen zu können. Da zu diesem Zeitpunkt die Friktionsbewegungen zumindest nachgelassen haben, bedeutet das keine große Erschwernis des Vorganges. In vielen Fällen tamponiert zudem der Schwellkörper des Penis das Scheidenrohr und hält die Scheide fest. Diese Tamponade kann bis zu 20 Minuten dauern. Nicht immer

gelang die Trennung der Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen vom Spermien enthaltenden Teil des Ejakulats vollkommen, da die Aufeinanderfolge der Phasen fast bei jedem einzelnen Rüden verschieden schnell abläuft. Am günstigsten war es, wenn der Penis groß genug war, um das Ejakulat direkt in das Auffangglas hinein ausstoßen zu können, also oft bei Hunden etwa in Schäferhundgröße. Die Samengläser wurden sodann mit ihrem Inhalt im Wasserbad von 25°C mit den bereitstehenden Verdünnern und Aufbewahrungsgläschen auf gleiche Temperatur gebracht. Die Verdünnung wurde dann an Ort und Stelle vorgenommen.

Es wurden sowohl die Gesamtejakulate als auch die zweiten Phasen von Ejakulaten untersucht. Abgesehen von den Unterschieden, die sich dabei zeigten, wurden auch sonst erhebliche Schwankungen deutlich. Die Menge von Gesamtejakulaten bewegte sich zwischen 3,5 und 18,0 ml., die der zweiten Phase zwischen 0,4 und 0,3 ml. Diese Werte wurden festgestellt bei 15 Gesamtejakulaten und 15 zweiten Fraktionen (siehe Übersicht I a).

Behelfsmäßige künstliche Scheide für Hunde



1. Mantelrohr aus Autokühlerschlauch,
a) Öffnung für Wasser
b) Öffnung für Lufteinlaß.
2. Pulsator, bestehend aus zwei an den Enden zusammengeklebten ineinandergeschobenen Stücken von Fahrradschläuchen.
3. Innenschlauch einer künstlichen Rinder- oder Ziegenscheide.
4. Gummiballgebläse.
5. Glastrichter.
6. Gummistopfen mit Kanüle.
7. Samenauffangglas.

Übersicht Ia

Datum	Menge in ml bei	
	Gesamtejakulaten	2. Phase
26. 7.	8,0	
	7,0	
	12,0	
30. 7.	14,0	
	11,0	
2. 8.	3,5	
		0,9
6. 8.	7,0	1,2
	6,0	
	18,0	
9. 8.	15,0	
		2,0
11. 8.	12,0	
		2,5
12. 8.		3,0
14. 8.		2,0
16. 8.	18,0	
		1,5
18. 8.	12,5	
		3,0
		3,0
20. 8.	12,0	
21. 8.	10,0	
23. 8.		2,0
		2,5
24. 8.		0,4
28. 8.		1,5
3. 9.		1,2

Gesamtejakulate hatten gewöhnlich ein milchwasserähnliches Aussehen. Sie waren je nach Dichte oder sonstigen Beimengungen gelblich-weiß oder weißlich-bläulich. Die Spermata der ersten Hauptphase ähnelten dem Bullen-

sperma. Sie waren undurchsichtig, weiß, oft mit Wolkenbildung und nicht dünnflüssig wie die Gesamtejakulate.

Die Dichte variierte bei Gesamtejakulaten von 50 000 bis 180 000, die der zweiten Phase von 240 000 bis 850 000 pro cmm. (Siehe Übersicht I b).

Übersicht I b

Datum	Dichte pro cmm in	
	Gesamtejakulaten	2. Phase
26. 7.	75 000 120 000 120 000	
30. 7.	60 000 65 000	
2. 8.	85 000	180 000 300 000
6. 8.	160 000 150 000 50 000	
9. 8.	60 000	
11. 8.	70 000	400 000 600 000
12. 8.		240 000
14. 8.		400 000 500 000
16. 8.	57 000	850 000
18. 8.	68 000	300 000 540 000
20. 8.	110 000	
21. 8.	160 000	
23. 8.		600 000 650 000
24. 8.		700 000
28. 8.		800 000
3. 9.		600 000

Der Unterschied in der Dichte zwischen Gesamtejakulat und zweiter Phase liegt darin begründet, daß die dritte Phase so gut wie spermienfrei ist und alle anderen an Menge übertrifft.

Der p_H -Wert der Gesamtejakulate bewegte sich zwischen 5,8 bis 6,7; der der zweiten Phase lag zwischen 5,9 und 6,1. Während das mikroskopische Bild der ersten Hauptphase wieder an das des Bullenspermias zu erinnern pflegte, wurde beim Gesamtejakulat die Verdünnung deutlich, die durch den Zutritt vor allem des Prostatasekretes mit der zweiten Hauptphase vor sich gegangen war, und die sich dann in den Resultaten bei der Bestimmung der Dichte widerspiegelte.

Bei der Betrachtung der zweiten Fraktion war die Massenbewegung im allgemeinen und unabhängig von der geschlechtlichen Beanspruchung gut. Im Gesamtejakulat gibt es keine Massenbewegung. Hinsichtlich der Vorwärtsbewegung gab es Ejakulate mit einer solchen von 100 % und andere, die nur 40 % aufwiesen. Der Anteil der Vorwärtsbewegung im Sperma von Hunden erwies sich als am größten und vor allem als am gleichmäßigsten bei wöchentlich einmaliger Samenentnahme. Bei erstmaligen Absamungen waren die Spermien oft weniger beweglich, und es befanden sich bis zu 15 % tote unter ihnen, wohl als Folge einer gewissen Überalterung. Bei zu häufiger Entnahme zeigte sich das Sperma weniger widerstandsfähig. So lebte unverdünntes Sperma der ersten Hauptphase ein und desselben Rüden nach der ersten Absamung 8 Stunden, bei der zweiten nach 3 Tagen 11 Stunden, nach weiteren 4 Tagen 12 Stunden, nach weiteren 2 Tagen 7 Stunden, bei erneuter Absamung am darauffolgenden Tage knappe 6 Stunden. In den selben zeitlichen Abständen entnommenes Sperma eines anderen Rüden überlebte unverdünnt 9, 12, 12, 10 und 6 Stunden.

In einigen Fällen waren nach 144 Stunden noch Vorwärts- und Ortsbewegung zu beobachten. Eine absolute Lebensdauer von 96 Stunden war nicht selten. Spermata von Hunden, die wöchentlich einmal abgesamt wurden, zeigten nach 20 Stunden noch eine Vorwärtsbewegung von 70 %, nach 36 Stunden noch eine solche von 60 %. Die Überlebensdauer von unverdünnten Gesamtejakulate schwankte zwischen 2 und 10 Stunden.

Alle diese Werte wurden nach Aufbewahrung bei einer Temperatur von $+5^{\circ}\text{C}$ erhalten.

DIE KONSERVIERUNG VON SPERMEN UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG IHRER PHYSIOLOGIE

Die Gewinnung von Sperma hat neben dem Zweck, der Erforschung der Lebensvorgänge zu dienen, heute vor allem den rein praktischen, die künstliche Samenübertragung zu ermöglichen. Der zeitliche Abstand zwischen Gewinnung und Übertragung ist jedoch oft nur überbrückbar durch Konservierung des Spermias. Es gilt also, das Leben der Spermien auch außerhalb des Organismus zu erhalten, in dem sie entstanden sind. Die Lebenszeit der Spermien ist von Natur selbstverständlich wie alles Leben begrenzt. Sie erfährt aber durch die Ejakulation eine wesentliche Kürzung, gleichgültig, ob die Spermien in der Folge dieses Ereignisses in das weibliche Genitale gelangen oder nicht. Sie kommen auf jeden Fall mit der Ejakulation in eine Umgebung, in der sie nur kurze Zeit am Leben bleiben können. Darüber kann nicht hinwegtäuschen, daß sie zunächst durch verschiedene Einwirkungen, wie durch die von Sekreten, Wärme oder des Zutritts von Sauerstoff erheblich aktiviert werden. In dieser Aktivität erschöpfen sich ihre Reserven, die unter natürlichen Verhältnissen nicht aufgefüllt werden.

Das Leben des Spermiums beginnt aber nicht mit der Ejakulation, die praktisch der Anfang vom Ende ist, sondern es lebt schon lange vorher. Es liegt im Nebenhodenschwanz, und dort existiert es unter optimalen Bedingungen, beim Hunde nach G ö t z e (8) bis zu 90 Tagen. Es müssen also Verhältnisse vorliegen, die eine solche Lebensdauer ermöglichen.

Nach unserer Kenntnis bestehen diese Bedingungen in dem Vorhandensein ernährender, im Nebenhoden gebildeter Sekrete, in der Resorption der Stoffwechselprodukte durch das Epithel des Nebenhodens, in der Anwesenheit von Schutzkolloiden, einer dichten, gleichsam ausgerichteten Lagerung, der Abschirmung gegen Sauerstoffzutritt, im Vorliegen eines verhältnismäßig niedrigen p_H -Wertes (etwa 5,6 bis 6,8), sowie in geringerem Gehalt an Elektrolyten. Hinzu kommt eine um 3 bis 4°C niedrigere Temperatur, als sie im Körperinneren herrscht.

Könnte man also ein Medium erstellen, das diesen Kriterien entspricht, so hätte man damit schon die Möglichkeit zu einer bedeutenden Verlängerung des Lebens ausgestossener Spermien.

Die gebräuchlichsten Zusätze und Puffer, die dem Sperma heute vor allem beim Rind zum Zwecke der Konservierung zugefügt werden, enthalten ernährende Stoffe. Bewährt haben sich in dieser Hinsicht Glukose und Fruktose. Die Folge dieser Ernährung - und die Spermien sind in der Lage, die gelösten Zucker aufzunehmen - ist ein Stoffwechsel, in dessen Verlauf bei der Glykolyse Milchsäure gebildet wird.

Da die Stoffwechselprodukte nun in das Medium hinein abgegeben werden, wird damit dessen Wasserstoffionenkonzentration verändert und zwar zuungunsten der Spermien. Während ein p_H -Wert um 6,0 insofern für die Aufbewahrung des Spermas günstig ist, als er dessen Bewegungsintensität dämpft, wirkt aber ein Wert unter 5,6 tödlich. Im Nebenhoden sichert die dort stattfindende Resorption der Stoffwechselprodukte gegen deren schädliche Auswirkungen. Dasselbe, nämlich Unschädlichmachung, wird bei Verdünnern durch Verwendung von Citrat- oder Phosphat-Puffern zu erreichen versucht. Da die Pufferungsfähigkeit aber ihre Grenzen hat, ist das Absinken des p_H -Wertes letzten Endes auch nur begrenzt hinauszuzögern.

Für Konservierungszusätze gelten demnach zunächst folgende Anforderungen: Sie müssen in der Lage sein, die Spermien zu ernähren. Neben eigenem, für das Sperma günstigen p_H -Wert, müssen sie ein gutes Pufferungsvermögen besitzen. Die Erhaltung der kolloidalen Schutzhülle der Spermien verdient besondere Beachtung. Der Traubenzucker hat deshalb als Bestandteil einer Verdünnungsflüssigkeit besondere Bedeutung, weil er neben seiner ernährenden auch eine die Schutzhülle der Spermien schonende Wirkung ausübt und ausserdem Nichtelektrolyt ist. Ferner wirken als Schutzkolloide in hohem Masse dem Sperma zugefügtes Eidotter und inaktiviertes Serum.

Sind Sperma und Verdünnungsflüssigkeit nicht isotonisch, so kommt es zu osmotischen Störungen, die sich vor allem in Verkrümmungen der Spermien aussern. Eine Verdünnungsflüssigkeit muß also daraufhin geprüft werden, ob sie isotonisch ist. Aber selbst im unverdünnten Sperma verändert sich der osmotische Druck infolge der Stoffwechselprodukte.

Die Massenbewegung ist Ausdruck der elektrischen Ladung, da sich die Spermien wegen ihrer gleichgerichteten und gleichstarken elektrischen Ladung gegenseitig abstossen. Diese elektrische Ladung ist umso stabiler, je weniger das Sperma durch Sekrete der akzessorischen Geschlechtsdrüsen oder Verdünnungsflüssigkeit verdünnt worden ist. Das Sperma des Nebenhodenschwanzes

hat eine stabile negative Ladung. Im Ejakulat wirken Elektrolyte mit starker positiver Ladung und ein Absinken des p_H -Wertes, das auf die Glykolyse und die damit verbundene Milchsäurebildung zurückzuführen ist, im Sinne einer Ladungsänderung bzw. -schwächung. Kommt es im Ejakulat zu einer verschiedenen elektrischen Ladung der Spermien, so bewirkt dies eine Agglutination, da ungleichnamige Pole einander anziehen. Dieser Vorgang wird auch als Altersagglutination bezeichnet.

Bei dem Versuch, die Lebensdauer der Spermien zu verlängern, indem man deren Stoffwechsel erhält, fördert man zwangsläufig die Bildung der schädlichen Milchsäure. Will man also zu einem Zustand gelangen, der den im Nebenhodenschwanz herrschenden Bedingungen gleichkommt, so scheint zwar das Vorhandensein einer Nährlösung und eines Puffers im Konservierungsmittel notwendig zu sein, vor allem aber muß der Stoffwechsel selbst weitgehend herabgesetzt werden, eine Bewegung also möglichst unterbunden und auch der Zutritt von Sauerstoff verhindert werden. Die Anwesenheit von Sauerstoff nämlich setzt in den Spermien den Eiweiß- und Lipoidstoffwechsel in Gang, führt somit also zum Verzehr der geringen eigenen Substanz der Spermien, die nicht ergänzt werden kann.

Zur Herabsetzung des Stoffwechsels kann die Erniedrigung der Temperatur herangezogen werden. Die Bewegungsintensität wird dabei herabgesetzt, die Lebensdauer jedoch verlängert. Selbst nach Gefrieren kann die Beweglichkeit bei der Erwärmung wieder eintreten. Die Herabsetzung der Temperatur führt über die Kälteträgheit zum Kälteschlaf, zu einem Ruhezustand also, in dem die Glykolyse nahezu aufhört. Mitwirkend dabei ist anscheinend der p_H -Wert, denn bei schwach saurer bzw. neutraler Reaktion tritt die Bewegung nach dem Auftauen erst sehr viel später ein als bei schwach basischer. Da Lebensdauer und Befruchtungsfähigkeit durch Kälteschock erheblich herabgesetzt werden können, ist die Geschwindigkeit, mit der die Abkühlung erfolgt, wesentlich. Durch geeignete Abstufung der Abkühlungsgeschwindigkeit kann der Kälteschock vermieden werden.

Als günstig für das Ruhestadium muß weiterhin ein möglichst geringer Gehalt an Elektrolyten bezeichnet werden. Das Ejakulat des Hundes hat einen verhältnismäßig hohen Gehalt an Elektrolyten, da es viel Sekret der akzessorischen Geschlechtsdrüsen enthält, eine Eigenschaft, die auch einen höheren p_H -Wert bedingt. Befinden sich nun Spermien in einem Medium mit hohem Gehalt an Elektrolyten, so führt dieses zu einer Schädigung der Schutzkolloide.

Auch die Neigung zur Agglutination wird auf zu reichlichen Elektrolytengehalt zurückgeführt. Allerdings sollen nach Lindahl und Kihlström (19) im Prostatasekret Antiagglutinine gegen die Kopf-an-Kopf-Agglutination enthalten sein. Als am wenigsten quellend, den Kolloidzustand am wenigsten gefährdend, gelten folgende Anionen:

Sulfate, Tartrate, Phosphate, Citrate und Azetate. Starke Quellungswirkung haben:

Chloride, Chlorate, Nitrate, Bromide, Jodide und Rhodanide.

Wenn man alle die oben angeführten Gegebenheiten berücksichtigt im Hinblick auf die Möglichkeit, das Leben der Spermien zu verlängern, so bieten sich im Nachahmen der im Nebenhoden gegebenen Situation zwei Wege an: Einmal der Versuch, durch Ernährung der Spermien deren Lebensvorgänge in Gang zu halten und sie gegen auftretende Schädlichkeiten durch geeignete Zusätze abzuschirmen.

Zum anderen aber kommt infrage die Anabiose, die Herabsetzung des Stoffwechsels.

Ersteres kann nur die Überbrückung sehr begrenzter Zeiträume bedeuten und die Möglichkeiten, die dazu gegeben sind, finden heute schon mehr oder weniger in der Praxis Anwendung. Die Herbeiführung der Anabiose kann jedoch zu wesentlich länger dauernder Konservierung lebender Spermien führen. Sie ist denkbar und auch schon angewandt in der Tiefgefrierung und beginnt schon mit der Bewegungslosigkeit der Spermien bei Temperaturen von -4 bis $+6^{\circ}\text{C}$.

Kalterschlaf und Kältestarre verringern die Lebensvorgänge auf ein Minimum. Im Zusammenhang damit entfällt nunmehr also auch die rapide Änderung des pH-Wertes, die sonst eintreten pflegt. Es entstehen allerdings neue Gefahren durch die beim Gefrieren veranlaßte Änderung der Konzentrationen und die Möglichkeit der Zellschädigung durch Eiskristalle. Da jede Zelle zu einem großen Teil aus Wasser besteht, kommt es beim Gefrieren zur Bildung von Eiskristallen im Protoplasma und zur Zerstörung der Zellstruktur. Je kleiner die Kristalle sind und je geringer ihre Anzahl ist, desto geringer werden auch die Zerstörungen sein, bzw. desto eher werden sie völlig unterbleiben. Das Einfrieren wird für eine Zelle also umso gefahrloser sein, je weniger Wasser sie enthält. Der Schädigung durch Kristalle wird durch Glycerinzusatz vorgebeugt. Glycerin beeinflusst Qualität und Quantität der Kristalle; es werden mehr und kleinere gebildet als ohne diesen Zusatz. Das Wasser kri-

stallisiert, zieht sich also aus der Lösung zurück. Damit steigt die Glyzerinkonzentration. Das bedeutet osmotischen Schock. Trotz der Gefahren, die die Tiefkühlung mit sich bringt, stellt sie einen gangbaren Weg der Samenkonservierung dar.

DIE KONSERVIERUNG VON HUNDESPERMA MIT HILFE VON

PUFFERN

Literatur

Bei der Betrachtung der Literatur über die beiden Wege, nämlich den der relativ kurzfristigen Konservierung durch Puffer und Zusätze und den der - wie erwartet wird - langfristigeren mittels Tiefkühlung, erwies es sich, daß für ersteren Fall Erfahrungen auch auf dem Gebiet der Konservierung von Hundesperma vorliegen. Hinsichtlich der Tiefgefrierung ergibt sich jedoch ein anderes Bild.

Die für die Konservierung von Hundesperma verwandten Zusätze haben sich zum Teil aus den für andere Tierarten gebräuchlichen entwickelt. So verwandte Biedermann (1) bei seinen Versuchen den Eidotter-Citrat-Verdüner für Rindersperma und den Verdüner für Pferdesperma nach Götz (7) (8). Er hat diesen Verdüner in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen erprobt und hatte bei einer Verdünnung von 1 : 3 oder 1 : 4 eine absolute Lebensfähigkeit von 72 Stunden erreicht bei folgender Zusammensetzung:

Eidotter	4,0
Glukose	6,0 bis 10,0
Aq. dest.	100,0.

Derselbe Autor benutzte Serum enthaltende Zusätze. Dabei erwies sich Hundeserum als besser im Vergleich zu Pferdeserum. Die absolute Lebensdauer betrug bei Verwendung des Serum-Glukose-Verdüners im Durchschnitt 96 Stunden. Bei Erhöhung des Glukoseanteils konnten 144 Stunden erreicht werden. Der Verdünnungsgrad betrug 1 : 4.

Die Zusammensetzung war folgende:

Hundeserum	10,0
Glukose	5,5 bis 7,0
Aq. dest.	100,0.

Überhaupt scheint der Verdünnungsgrad von 1 : 4 der bewährteste zu sein. Auch Slomkowski - zit. nach Biedermann (1) - benutzte ihn. Er erzielte

eine absolute Lebensdauer von 384 Stunden mit einem Verdüner nachstehender Zusammensetzung:

Boviserin	50,0
Glukose	6,5
Aq. dest.	100,0

M i l o w a n o w (20) erzielte 24 Stunden Lebensdauer mit Glukose-Tartrat:

Glukose	3,42
K-Na-Tartrat	1,13
Pepton	0,3
Aq. dest.	100,0

Brochard und Coulomb (2) kamen in ihren Versuchen zu dem Schluß, daß man mit hypertonischem Eigelb-Na-Citrat-Verdüner und isotonischem Dotter-Fruktose-Verdüner auf eine Lebensdauer bis zu vier Tagen kommen könne bei kräftiger Bewegung von 50 %.

Die Verwendung von Zucker, sei es Glukose oder Fruktose, erscheint in der Literatur immer wieder, ebenso wie auch die Citrat-Puffer anderen vorgezogen werden. Zur Agglutination der Spermien im Dotter-Citrat-Verdüner schrieb J a h n e l (14), daß dies durch Erhitzen des Verdünners auf 60°C für eine halbe Stunde zu vermeiden sei.

Bei der Diskussion, ob es für die Konservierung von Spermien besser sei, Glukose oder Fruktose zum Dotter-Citrat-Puffer zu benutzen, entschied sich S h e r g i n (29) für Fruktose. Bei der Umwandlung von Fruktose im Verlaufe des Stoffwechsels der Spermien soll weniger Milchsäure entstehen als bei der der Glukose. Demnach würde bei Verwendung von Fruktose im Puffer der p_{H} -Wert weniger rasch sinken.

R o y und B i s h o p (27) untersuchten den Einfluß von Glycin auf die Lebensdauer von Spermien. Sie beurteilten Citrat- und Phosphat-Puffer als nur etwa für drei Tage brauchbar. Tiefgekühltes Sperma halte zwar länger, seine Verwendung sei jedoch in praxi zu umständlich. Zunächst setzten sie einem Citrat-Puffer Glycin zu, so daß folgende Zusammensetzung entstand:

Na-Citrat	3,2
Glycin	0,75
Aq. dest. ad.	100,0

Danach verwandten sie Glycin und Dotter zu gleichen Teilen im Verdünner. Sie erhielten damit beim Bullensperma eine durchschnittliche Lebensdauer von 6 Tagen. Das Zufügen von Elektrolyten zeitigte eine schlechte Wirkung, das von Fruktose in kleinen Mengen eine günstige, die individuell verschieden war.

F l i p s e (6) setzt in diesem Zusammenhang voraus, daß Glycin eine hemmende Wirkung auf die Glykolyse haben müsse. Glycin - auch Glykokoll oder α -Aminoessigsäure - ist eine einbasische Monoaminosäure und als solche Bestandteil der meisten Eiweißkörper.

Einen anderen Weg beschritt H a r r o p (11; 12; 18), denn viele für Bullensperma geeignete Zusätze und Puffer sind für Hundesperma unverträglich. H a r r o p verdünnte ähnlich der von T h a c h e r und A l m q u i s t beschriebenen Methode in folgender Weise: Die zweite Fraktion des Ejakulats wird mit erhitzter, pasteurisierter Milch verdünnt. Dazu wird die Milch zunächst langsam erhitzt und 10 Minuten lang auf 92 ° C gehalten. Dann erfolgt Abkühlung bis auf Zimmertemperatur. Die Haut, die sich auf der Milch gebildet hat, soll unversehrt bleiben. Nach Untersuchung des Spermas auf Beweglichkeit wird dieses mit der Milch im Verhältnis 1 : 7 bis 1 : 8 verdünnt. Darauf wird es in ein Thermosgefäß mit 44 ° C verbracht. Nach der Verschickung von auf diese Weise behandelten Sperma von England nach New York ergab sich bei der Untersuchung folgendes Bild:

Nach 53 Stunden 60 % beweglich, überwiegend vorwärts.

Nach 173 " 30 % beweglich, übergehend von der Vorwärts- in die Ortsbewegung.

Nach 387 " 20 % beweglich, vorwiegend Ortsbewegung
(mostly bunting and oscillatory).

Mit solchem Sperma erfolgte Befruchtung. Das Sperma war zum Zeitpunkt der Besamung 140 Stunden alt. Die Hündin warf normale Welpen.

K e r r u i s h (16) beurteilte den Gebrauch von homogenisierter Milch als ungünstig für das Leben der Spermien bei längerer Dauer der Aufbewahrung. Magermilch sei dagegen immer gut.

Hinsichtlich der Verwendung von Eidotter kam B l a c k s h a w (3) zu dem Ergebnis, daß Dotter und Lecithin der Milch und Lipoprotein überlegen seien,

auch im Hinblick auf Schutz vor Kälteschock.

Unter Beachtung all dieser in der Literatur vorgefundenen Forschungsergebnisse wurde mit den eigenen Versuchen begonnen.

Eigene Versuche

Im Verlaufe der Versuche wurden zunächst reine Dotter-Glukose-Verdüner auf ihre Verwendbarkeit hin untersucht. Der erste Schritt bestand in der Ermittlung der für das Leben der Spermien zuträglichsten Konzentrationen. Es wurden 36 Versuche mit Dotter-Glukose angesetzt und zwar in der Weise, daß das Sperma eines Ejakulates jeweils mit verschiedenen Konzentrationen des Zusatzes verdünnt wurde. Es wurde dabei die zweite Phase der Ejakulate bevorzugt, da Gesamtejakulate zu schlechte Voraussetzungen für eine Konservierung mitbringen, und damit untauglich sind, was sich in jedem Falle erwies. Für die nachstehenden Konzentrationen ergab sich folgendes Bild:

Übersicht II

	Glukose-Konzentrationen				
	8	6	5	4	3
Maximale Lebensdauer in Std.	144	168	<u>192</u>	120	96
Minimale Lebensdauer in Std.	72	72	72	48	48
Durchschnittliche Lebensdauer in Std.	102	116	<u>144</u>	90	78

Die zuträglichste Konzentration schien demnach zwischen 5 % und 6 % zu liegen. Weitere Verdünnungsreihen zu 5 %, 5,5 % und 6 % Glukose ergaben Resultate, die in Übersicht III zusammengefaßt sind.

Übersicht III

	Glukose-Konzentrationen		
	6	5,5	5
Maximale Lebensdauer in Std.	168	168	<u>192</u>
Minimale Lebensdauer in Std.	72	144	72
Durchschnittliche Lebensdauer in Std.	156	156	<u>164</u>

Betrachtet man Vorwärts- und Ortsbewegung in den einzelnen Konzentrationen nach Ablauf von 3 bzw. 4 Tagen, so zeigt sich folgender Stand (Übersicht IV):

Übersicht IV

	Glukose-Konzentrationen					
	8	6	5,5	5	4	3
Minim. Vorwärtsbewegung in %	0	0	60	0	0	0
Maxim. Vorwärtsbewegung in %	60	80	80	80	30	10
Durchschnittliche Vorwärtsbewegung in %	32,5	33,3	66,6	46,6	12,5	2,5

Läßt man jedoch 2 besonders schlechte Ejakulate unberücksichtigt, so ergibt sich in Übersicht V ein anderes Bild.

Übersicht V

	Glukose-Konzentrationen					
	8	6	5,5	5	4	3
Minim. Vorwärtsbewegung in %	60	50	60	60	20	0
Maxim. Vorwärtsbewegung in %	60	80	80	80	30	10
Durchschnittliche Vorwärtsbewegung in %	60	62,5	66,6	65	25	5
Durchschnittliche Ortsbewegung in %	10	17,5	10,6	10	15	22,5

26 Versuche mit Dotter-Fruktose-Verdünner wiesen ähnliche Ergebnisse auf (Übersicht VI):

Übersicht VI

	Fruktose-Konzentrationen				
	8	6	5	4	3
Maximale Lebensdauer in Std.	168	<u>192</u>	<u>192</u>	120	120
Minimale Lebensdauer in Std.	120	144	144	72	72
Durchschnittliche Lebensdauer in Std.	136	<u>158,4</u>	<u>158,4</u>	96	96

Auch hier wieder ein Optimum zwischen 5 und 6 %.

Im Vergleich der Konzentrationen 6 %, 5,5% und 5 % ergab sich dann bei allen dreien eine maximale Lebensdauer von 192 Stunden und eine durchschnittliche von 168 Stunden.

Hinsichtlich der Vorwärts- und Ortsbewegung nach 3 bzw. 4 Tagen zeigte sich Folgendes (Übersicht VII):

Übersicht VII

	Fructose-Konzentrationen					
	8	6	5,5	5	4	3
Minim. Vorwärtsbewegung in %	30	30	40	40	10	0
Maxim. Vorwärtsbewegung in %	40	<u>70</u>	<u>70</u>	<u>70</u>	50	10
Durchschnittliche Vorwärtsbewegung in %	30,3	44	<u>53,3</u>	52	23,3	3,3
Durchschnittliche Ortsbewegung in %	13,3	18	20	16	13,3	20

Vergleicht man die besten Konzentrationen von Glukose und Fructose, so zeigt sich eine leichte Überlegenheit der Fructose. Auch sank der pH-Wert bei Glukose-Verdünnern in einigen Fällen um ein Geringes schneller und tiefer.

Diese Beobachtung kann mit der Ansicht von S h e r g i n (29) übereinstimmen, nach der Fructose weniger Milchsäure bildet als Glukose. Einige Versuche wurden besonders zum Zwecke des Vergleiches so ausgeführt, daß ein und dasselbe Ejakulat sowohl mit Glukose als auch mit Fructose verdünnt wurde.

Übersicht VIII

	Glukose-Konzentration			Fructose-Konzentration		
	5	5,5	6	5	5,5	6
Maxim. Lebensdauer in Std.	<u>192</u>	168	168	<u>192</u>	<u>192</u>	<u>192</u>
Durchschnittliche Lebensdauer in Std.	164	156	156	<u>168</u>	<u>168</u>	<u>168</u>
Durchschn. Vorwärtsbeweg. n. 3-4 Tg. i. %	46,6	<u>66,6</u>	33,3	52	53,3	44

Bedenkt man nun, daß unverdünntes, bei +5°C aufbewahrtes Sperma der zweiten Fraktion eine Lebensdauer von 96 Stunden, ja nicht selten von 144 Stunden erreichte, so erscheint die Leistung der Glukose- und Fruktose-Verdüner nicht als sehr erheblich. Das erklärt sich leicht, da ja mit diesen Stoffen zwar ernährende Substanz zugefügt wird, die Möglichkeit der Milchsäurebildung durch Glykolyse also gefördert wird, andererseits aber ein Pufferungsvermögen, wie es den Citrat- oder Phosphatpuffern eigen ist, fehlt.

Die Wirkung von reinen Dotter-Glycin-Verdünnern auf Spermien war sehr unbefriedigend. Bei einer Glycinkonzentration von 2 % im Verdüner betrug die Lebensdauer 96 Stunden. Dasselbe Ergebnis hatte die 1,5 %ige Glycinlösung, während die 1 %ige nur 84 Stunden und die 0,5 %ige 72 Stunden erzielten.

Der Vorgang bei der Untersuchung der Verträglichkeit von Citrat- und Phosphat-Puffern war dem der vorangegangenen Versuche gleich. Mit reinen Eidotter-Citrat-Verdünnern verschiedener Konzentrationen wurden 55 Versuche ausgeführt. Die Lebensdauer von Gesamtejakulaten überschritt die 72-Stunden-Grenze nicht und wurde in den folgenden Übersichten deshalb nicht berücksichtigt. Der Vergleich der Konzentrationen von 4 %, 3 %, 2,5 %, 2 %, 1,5 %, 1 % und 0,5 %, immer vorgenommen jeweils an ein und demselben Ejakulat, kommt in Übersicht IX zum Ausdruck.

Übersicht IX

	Na-Citrat-Konzentrationen						
	4	3	2,5	2	1,5	1	0,5
Durchschnittliche Lebensdauer in Std.	114	<u>198</u>	144	129	144	96	72
Maxim. Lebensd. in Std.	120	<u>264</u>	168	144	144	120	72
Minim. Lebensd. in Std.	96	120	120	96	144	72	72
Durchschn. Vorw. Bewg. nach 3-4 Tg. in %	21,5	50	50	40	70	10	10
Maxim. Vorw. Beweg. nach 3-4 Tg. in %	30	70	80	70	70	20	10
Minim. Vorw. Bew. nach 3-4 Tg. in %	5	30	30	30	70	0	10
Durchschn. Ortsbew. n. 3-4 Tg. in %	27,2	15	20	20	10	17	30

Nach dieser Anordnung erwiesen sich Na-Citrat-Puffer von 3 und 2,5 % als am besten, wenn man beides, absolute Lebensdauer und Bewegungsintensität nach 3 bzw. 4 Tagen im Zusammenhang betrachtet.

Versuchsreihen mit den Konzentrationen 3,2 %, 3 %, 2,8 % und 2,6 % sind mit ihren Ergebnissen in Übersicht X zusammengefaßt.

Übersicht X

	Na-Citrat-Konzentrationen			
	3,2	3	2,8	2,6
Durchschnittl. Lebensdauer in Std.	228	<u>233,1</u>	186	162
Maxim. Lebensdauer in Std.	<u>264</u>	<u>264</u>	192	192
Minim. Lebensdauer in Std.	192	144	168	120
Durchschnittliche Vorwärtsbewegung nach 3-4 Tagen in %	60(68)	<u>65,7</u> (66)	62,5	52,5
Maxim. Vorwärtsbewegung n. 3-4 Tg. in %	<u>80</u> (80)	<u>80</u> (80)	70	70
Minim. Vorwärtsbewegung n. 3-4 Tg. in %	20(50)	40(50)	50	40
Durchschnittliche Ortsbewegung nach 3-4 Tg. in %	18,5	15,7	18,5	17,2

Die in der Übersicht X in Klammern gesetzten Zahlen sind Werte, die nach Fortlassen eines Ejakulates erhalten wurden, dessen Spermien von schwacher Lebenskraft waren.

Hinsichtlich der absoluten Lebensdauer ist der 3 %ige Puffer den anderen überlegen. Sein Abstand zum 3,2 %igen Verdünnungsmittel ist allerdings nicht groß. Bei der Berücksichtigung der Bewegungsintensität nach 3 bis 4 Tagen bleibt die Überlegenheit des 3 %igen Puffers bestehen, doch rangieren die von 3,2 %

und 2,8 % fast gleich. Zieht man in Betracht, daß der Prozentsatz von Spermproben, die einen Zeitraum von 10 Tagen oder mehr nach der Ejakulation überdauerten, sowohl bei der Konzentration von 3,2 % als auch bei der von 3 % im Durchschnitt 66,6 betrug, so zeigt sich, daß man von nahezu gleichwertigen Leistungen sprechen muß, die sicher bei einzelnen Ejakulaten sozusagen individuell verschieden sein werden. Vergleicht man die Bewegungsinintensität nach 8 Tagen bei einigen Proben der beiden Puffer, die 10 Tage überlebt hatten, so zeigt sich Folgendes:

Übersicht XI

Ejakulats-Nr.	3,2 %		3 %	
	Vorwärtsbewegung	Ortsbewegung	Vorwärtsbewegung	Ortsbewegung
23	40 %	30 %	40 %	30 %
29	20	10	20	20
30	30	30	30	20
30	30	20	40	20

Es kann also nicht von einer Überlegenheit der einen Pufferkonzentration gegenüber der anderen gesprochen werden.

56 Versuche dienten der Überprüfung verschiedener Konzentrationen beim Na-Phosphat-Puffer. Sie entsprachen in ihrer Anordnung denen beim Na-Citrat-Verdünnung. Die Ergebnisse sind aus Übersicht XII zu ersehen. Hier lagen - ähnlich wie beim Na-Citrat-Puffer - die besten Ergebnisse bei Konzentrationen zwischen 2,5 und 4 %.

Übersicht XII

	Na-Phosphat-Konzentrationen						
	4	3	2, 5	2	1, 5	1	0, 5
Durchschnittliche Lebensdauer in Std.	156	186	<u>192</u>	156	156	72	72
Maxim. Lebensdauer in Std.	168	<u>240</u>	216	168	168	96	96
Minim. Lebensdauer in Std.	144	168	168	120	144	48	48
Durchschnittliche Vorwärtsbewegung nach 3-4 Tg. in %	45	57, 5	<u>62, 5</u>	35	30	5	0
Maximale Vorwärtsbewegung nach 3-4 Tagen in %	<u>80</u>	<u>80</u>	<u>80</u>	70	40	10	0
Minimale Vorwärtsbewegung nach 3-4 Tagen in %	10	40	50	10	20	0	0

Weitere Versuchsreihen mit den Konzentrationen 4 %, 3, 5 %, 3 % und 2, 5 % sind in Übersicht XIII mit ihren Resultaten zusammengefaßt.

Übersicht XIII

	Na-Phosphat-Konzentrationen			
	4	3, 5	3	2, 5
Durchschn. Lebensdauer in Std.	229, 7	<u>232</u>	207	192
Maxim. Lebensd. in Std.	<u>264</u>	<u>264</u>	216	192
Minim. Lebensd. in Std.	168	168	<u>192</u>	<u>192</u>
Durchschn. Vorw. Bewg. nach 3-4 Tg. in %	<u>60</u>	<u>60</u>	58	42, 5
Maxim. Vorw. Bewegung	<u>70</u>	<u>70</u>	<u>70</u>	60
Minim. Vorw. Bewegung	30	40	50	10

Hieraus geht hervor, daß Puffer mit 3,5 % und 4 % Na-Phosphat tiefere Minimaleistungen erbrachten als die mit 2,5 % und 3 %, obwohl erstere die Letzteren in der durchschnittlichen und maximalen Lebensdauer übertrafen. Das führte zu einer Überprüfung hinsichtlich der Herkunft der Ejakulate mit den niedrigsten Minimalwerten. Es handelte sich dabei um drei Ejakulate von ein und demselben Hund, die jeweils im Abstand von einer Woche gewonnen worden waren. Es scheint demnach mitunter individuelle optimale Pufferkonzentrationen zu geben, die zu ergründen im praktischen Fall dann notwendig sein dürfte.

Die Überlegenheit der Konzentrationen von 3,5 % und 4 % zeigte sich auch darin, daß es nur mit ihnen gelang, eine Lebensdauer von 10 Tagen und darüber zu erreichen, mit Ausnahme eines Falles mit einer Konzentration von 3 %. Der Anteil der Proben, deren Lebensdauer die Grenze von 10 Tagen erreicht oder überschritten hatte, betrug beim 4 %igen Na-Phosphat-Puffer 71,4 %, beim 3,5 %igen 66,6 %. Der Vergleich von Vorwärts- und Ortsbewegung derartiger Verdünnungsproben miteinander nach Ablauf von 8 Tagen (192 Std.) sah folgendermassen aus:

Übersicht XIV

Ejakulat- Nr.	Na-Phosphat-Konzentrationen			
	4 %		3,5 %	
	Vorwärts- bewegung	Orts- bewegung	Vorwärts- bewegung	Orts- bewegung
26	30 %	30 %	30 %	30 %
29	20	20	40	20
30	20	20	20	20
30	30	20	20	30

Demnach sind beide Konzentrationen gleichwertig, wenn man gegebenenfalls die individuelle optimale Konzentration berücksichtigt.

Der Vergleich zwischen den besten Na-Citrat- und Na-Phosphat-Puffern ist aus Übersicht XV zu ersehen.

Übersicht XV

	Na-Citrat		Na-Phosphat	
	3, 2 ‰	3 ‰	4 ‰	3, 5 ‰
Durchschnittliche Lebensd. in Std.	228	<u>233, 1</u>	229, 7	232
Maxim. Lebensdauer in Std.	264	264	264	264
Minim. Lebensdauer in Std.	192	144	168	168
Durchschnittliche Vorwärtsbewegung nach 8 Tagen in ‰	30	<u>32, 5</u>	25	27, 5
Maximale Vorwärtsbewegung nach 8 Tagen in ‰	40	40	30	40
Minimale Vorwärtsbewegung nach 8 Tagen in ‰	20	20	20	20

Aus dieser Übersicht ergibt sich eine Überlegenheit des Citrat-Puffers. Bei der Betrachtung von Ejakulaten, die sowohl mit Citrat- als auch mit Phosphat-Puffern verdünnt worden waren, zeigte sich diese Überlegenheit nicht.

Nach Abschluß der Versuchsreihen, die mit Ausnahme eines Eidotteranteils von 10 ‰ reine Glukose-, Fruktose-, Citrat- oder Phosphat-Verdünner enthielten, wurde nunmehr mit Mischungen aus den obengenannten Substanzen gearbeitet. Dabei wurden folgende Werte erhalten (siehe Übersicht XVI a, XVI b, XVI c):

Übersicht XVI a

Verdünner	Lebensdauer in Stunden		
	Durchschnittlich	Maximal	Minimal
Na-Citrat-Glukose-Glycin	168	240	120
Na-Citrat-Fruktose-Glycin	176,6	240	120
Na-Citrat-Glycin	128	192	72
Fruktose-Glycin	176,4	240	144
Glukose-Glycin	180,6	216	144
Glukose	155	216	120
Na-Citrat	<u>222,8</u>	<u>264</u>	<u>168</u>

Übersicht XVI b

Verdünner	Vorwärtsbewegung nach 3- 4 Tagen in %		
	Durchschnittlich	Maximal	Minimal
Na-Citrat-Glukose-Glycin	21,1	40	10
Na-Citrat-Fruktose-Glycin	43	60	30
Na-Citrat-Glycin	28	60	10
Fruktose-Glycin	44,3	60	30
Glukose-Glycin	42,2	50	30
Glukose	38,5	60	20
Na-Citrat	<u>56,4</u>	<u>70</u>	30

Übersicht XVI c

Verdünner	Vorwärtsbewegung nach 8 Tagen in %		
	Durchschnittlich	Maximal	Minimal
Na-Citrat-Glukose-Glycin	24,2	<u>50</u>	10
Na-Citrat-Fruktose-Glycin	21,6	40	10
Na-Citrat-Glycin	0	0	0
Fruktose-Glycin	28	30	20
Glukose-Glycin	16,6	20	10
Glukose	12,5	20	5
Na-Citrat	<u>30,8</u>	40	10

Aus diesen Übersichten ist ersichtlich, daß ausser den gemischten auch reine Na-Citrat- und Glukose-Verdüner zum Vergleich verwendet wurden. Das Ergebnis zeigt eindeutig die Überlegenheit des Na-Citrat-Puffers, dem Fruktose-Glycin und Na-Citrat-Fruktose-Glycin folgen, dann Na-Citrat-Glukose-Glycin und Glukose. Das Bild ändert sich geringfügig, wenn man beachtet, mit welchem Prozentsatz die einzelnen Verdüner mit der besten oder zweitbesten Leistung an der Summe aller Versuche beteiligt sind, die mit ihnen angestellt wurden. Na-Citrat war zu 100 % an den besten Leistungen beteiligt; es folgten Fruktose-Glycin mit 54,2 %, Na-Citrat-Glukose-Glycin mit 45,5 %, Na-Citrat-Fruktose-Glycin mit 38,4 %, Glukose mit 23 %, Glukose-Glycin mit 11,1 % und Na-Citrat-Glycin mit 0 %.

Als beste Konzentrationen innerhalb der Mischungen stellten sich im Verlauf der Versuche folgende heraus:

Na-Citrat	3,0		Na-Citrat	3,0		Na-Citrat	3,0
Glycin	3,0		Glycin	3,0		Glycin	3,0
Glukose	5,0		Fruktose	5,0			
			Glukose	5,0		Fruktose	5,0
			Glycin	3,0		Glycin	3,0

Diese Verdüner enthielten sämtlich 10 % Eidotter. Sie waren dem reinen Eidotter-Citrat-Verdüner alle unterlegen.

In der Folge wurden verschiedene Milchverdüner erprobt. Dazu wurde zunächst gewöhnliche, pasteurisierte Milch verwandt, die nach den Angaben von Harrop (12) auf 92°C kurzfristig erhitzt worden war. Die so behandelte Milch wurde nach Abkühlung mit und ohne Zusatz von Dotter als Verdüner benutzt. Sodann wurden Milchverdüner aus Magermilchpulver (Magermilchpulver 10,0 und Aq. dest 100,0) hergestellt, und zwar ohne Dotter, mit Dotter und mit Dotter und Na-Citrat. Es wurden die verschiedenen Milchverdüner jeweils am gleichen Ejakulat überprüft und auch gleichzeitig Na-Citrat-Verdüner und Na-Citrat-Fruktose-Glycin-Puffer zum Vergleich verwendet. Die Ergebnisse sind in Übersicht XVII zusammengefaßt.

Übersicht XVIIIa

Verdünner	Lebensdauer in Stunden		
	Durchschnittlich	Maximal	Minimal
Pasteurisierte Milch	104	120	96
Pasteur. Milch-Dotter	88	96	72
Magermilch	273	<u>336</u>	168
Magermilch-Dotter	<u>303, 2</u>	<u>336</u>	240
Magermilch-Dotter			
Na-Citrat	250, 9	288	168
Na-Citrat	248	264	240
Na-Citrat-Fruktose-Glycin	224	240	216

Übersicht XVII b

Verdünner	Vorwärtsbewegung nach 8 Tagen in %		
	Durchschnittlich	Maximal	Minimal
Pasteurisierte Milch	0	0	0
Pasteur. Milch-Dotter	0	0	0
Magermilch	40, 9	<u>60</u>	40
Magermilch-Dotter	<u>44, 5</u>	<u>60</u>	30
Magermilch-Dotter-			
Na-Citrat	32, 7	50	20
Na-Citrat	33, 3	40	20
Na-Citrat-Fruktose-			
Glycin	33, 3	40	30

Der Magermilch-Dotter-Verdünner hatte also die besten Resultate. Überhaupt übertrafen die Magermilch-Verdünner alle anderen.

ÜBERBLICK ÜBER DIE KONSERVIERUNG MIT PUFFERN UND VERDÜNNERN.

Beobachtet wurden insgesamt 344 Verdünnungen aus 58 Ejakulaten. Da aus der Literatur u. l. eigenen Ejakulatsuntersuchungen die kürzere Überlebensdauer des Gesamtejakulates bekannt war, wurden in der Hauptsache die ersten Hauptphasen der Ejakulate herangezogen. Nur 54 Verdünnungen aus 8 Gesamtejakulaten wurden vorgenommen. Sie erwiesen sich sämtlich als kurzlebig, trotz konservierender Zusätze.

Vor der Vermischung wurden Verdünner und Ejakulat bei 25°C im Wasserbad gehalten und so auf gleiche Temperatur gebracht. Die Mischung wurde sofort nach der Samengewinnung vorgenommen und zwar im Verhältnis 1 : 4. Nach der Verdünnung wurde das Sperma abgekühlt und bei +5°C im Kühlschrank aufbewahrt. Bei der jeweiligen Untersuchung mußte während der Entnahme der Spermaprobe möglichst jede Temperaturänderung vermieden werden. Das Samengläschen mit der gerade zu untersuchenden Probe wurde deshalb in ein feuchtes Schwammkissen gesteckt, das sich schon vorher im Kühlschrank befand und also Kühlschranktemperatur hatte. Dieses Kissen wurde dann kurzfristig dem Schrank entnommen, um sofort nach der Übertragung eines Spermatropfens auf einen Objektträger zurückbefördert zu werden. Der Objektträger wurde auf dem Heiztisch des Mikroskopes auf 38°C bis 40°C erwärmt, worauf die Beobachtung erfolgte. Zu gleicher Zeit wurde mit Indikatorpapier der p_H -Wert der Probe festgestellt. Der p_H -Wert des aufbewahrten, verdünnten Spermas sinkt um so tiefer, je länger die Aufbewahrung dauert. Es ist dies die Folge der Glykolyse, also des Stoffwechsels der Spermien. Der Grad des Absinkens des p_H -Wertes scheint um so höher zu sein, je aktiver die Spermien in ihrer Bewegung sind. Es ist niedriger bei gutem Pufferungsvermögen der Verdünner. So kann bei ein und demselben Ejakulat der Unterschied zwischen den p_H -Werten von Glukose- und Na-Citrat-Verdünnern bei der jeweilig letzten Untersuchung 0,2 bis 0,4 betragen, obwohl die citratverdünnte Probe eine längere Aufbewahrungszeit überlebte.

Bei allen Verdünnern kam Agglutination von Spermien vor. Da auch ohne Zusatz zum Sperma in diesem Agglutination zu beobachten war, braucht dieses Geschehen seine Ursache nicht im Verdünner zu haben. Spermaschädigungen durch Gummi, Glas oder andere Faktoren können ebensowohl verantwortlich gemacht werden. Nach Lindahl und Kihlström enthält das Ejakulat im Prostatasekret Antiagglutinine gegen die Kopf-an-Kopf-Agglutination der

Spermien. Es wurde jedoch bei den Versuchen auch im Gesamtejakulat, das doch überwiegend aus Prostatasekret besteht, Agglutination beobachtet und zwar in nicht geringerem Masse als in den anderen Fällen. Die Erscheinung wird also wohl u. a. auch auf eine Schädigung der Spermien bei der Gewinnung oder bei den Vorgängen der Konservierung zurückzuführen sein. Auch das Erhitzen der Verdünner auf 60°C nach den Angaben von J a h n e l (14) hat darin keine Abhilfe schaffen können. Die Angaben über die absolute Lebensdauer sind so zu verstehen, daß innerhalb der angegebenen Zeit noch eine Vorwärts- oder Ortsbewegung festgestellt werden konnte. Als solche wurden nur deutliche Bewegungen angesehen, nicht etwa ganz vereinzelte, schwache, langsame Schlängel- oder Drehbewegungen. Häufig zeigte sich bei der Vitalfärbung, daß bewegungslose Spermien noch nicht tot waren. Entscheidend für das Ausserachtlassen dieser Lebensanzeichen war die Ansicht, daß die sich darin ausdrückende Lebenskraft zu unerheblich war, um von Wert für die Beurteilung dieses oder jenes Konservierungsverfahrens zu sein.

Das Schicksal des verdünnten Spermas hängt sicher nicht allein von den Zusätzen ab. Die Qualität des einzelnen Ejakulates, noch viel mehr aber die Spermaqualität des jeweiligen Rüden überhaupt haben entscheidenden Einfluß. Es gibt Rüden mit durchweg lebenskräftigem Sperma und solche, die regelmäßig das Sperma mit der kürzesten Lebensdauer liefern, und zwar kam bei den Versuchen diese Eigenschaft dann bei Verdünnern mit beliebiger Zusammensetzung zum Vorschein. Es konnte weiterhin beobachtet werden, daß das Sperma des einen Hundes eine andere Pufferkonzentration bevorzugte als das des anderen, obwohl derartige als Ausnahme von der Regel bezeichnet werden kann. Daß Sperma mit besonders starker Massenbewegung lebenskräftiger war als solches mit schlechthin guter, konnte nicht beobachtet werden. Auch die Intensität der Einzelbewegung kann nur insofern als Maßstab für zu erwartende Lebensdauer gelten, als Dreh- und Kreisbewegungen - ebenso wie ein hoher Prozentsatz an toten und abnormen Spermien - nicht für Gesundheit des Spermas sprechen. Sicher aber scheint zu sein, daß sich nicht jeder Hund hinsichtlich seiner Spermaqualität als Spender von Ejakulaten für die Konservierung eignet. Der Vergleich aller Verdünner soll in den Übersichten XVIII a und XVIII b erfolgen.

Übersicht XVIII a

Verdünner	Absolute Lebensdauer in Stunden		
	Durchschnittlich	Maximal	Minimal
Glukose	164	192	72
Glukose-Glycin	180, 6	216	144
Fruktose	168	192	144
Fruktose-Glycin	176, 4	240	144
Na-Citrat	233, 1	264	144
Na-Citrat-Glycin	128	192	72
Na-Citrat-Glukose-Glycin	168	240	120
Na-Citrat-Fruktose-Glycin	176, 6	240	120
Na-Phosphat	232	264	168
Pasteur. Milch	104	120	96
Pasteur. Milch-Dotter	88	96	72
Magermilch	273	<u>336</u>	168
Magermilch-Dotter	<u>303, 2</u>	<u>336</u>	<u>240</u>
Magermilch-Dotter- Na-Citrat	250, 9	288	168

Übersicht XVIII b

Verdüner	Vorwärtsbewegung nach 8 Tagen in %		
	Durchschnittlich	Maximal	Minimal
Glukose	0	0	0
Glukose-Glycin	16,6	20	10
Fruktose	0	0	0
Fruktose-Glycin	28	30	20
Na-Citrat	32,5	40	20
Na-Citrat-Glycin	0	0	0
Na-Citrat-Glukose-Glycin	24,2	50	10
Na-Citrat-Fruktose-Glycin	21,6	40	10
Na-Phosphat	27,5	40	20
Pasteur. Milch	0	0	0
Pasteur. Milch-Dotter	0	0	0
Magermilch	40,9	<u>60</u>	40
Magermilch-Dotter	<u>44,5</u>	<u>60</u>	30
Magermilch-Dotter-Na-Citrat	32,7	50	20

Daraus ergibt sich die Überlegenheit der Magermilchverdünner über alle anderen. Der beste von ihnen, nämlich der Magermilch-Dotter-Verdüner (Magermilchpulver 10,0; Dotter 10,0; Aq. dest 100,0), erzielte eine durchschnittliche Lebensdauer von 303,2 Stunden, bei maximalen Werten von 336 und minimalen von 240 Stunden. Seine durchschnittliche Leistung hinsichtlich der Vorwärtsbewegung nach Ablauf von 8 Tagen lag bei 44,5 %, die maximale bei 60 % und die minimale bei 30 %. Die leistungsmässige Reihenfolge der weiteren Verdünner ist:

Magermilch, Magermilch-Dotter-Citrat, Na-Citrat, Na-Phosphat und Fruktose-Glycin.

Der Zusatz von Glycin erwies sich bei Glukose- oder Fruktose-Verdünnern als

etwas verbessernd. Eine wirklich wesentliche Verlängerung der Lebensdauer, die dem Aufwand nach als lohnend erschien, konnte jedoch nur bei den Magermilchverdünnern und den reinen Citrat- und Phosphat-Puffern erzielt werden.

DIE GLYZERINVERTRÄGLICHKEIT BEIM

HUNDESPERMA

Literatur

Beim Einfrieren von Sperma droht die Gefahr der Zellschädigung durch Kristallbildung. Dieser Gefahr trachtet man zu begegnen, indem man dem Verdüner, der bei der Konservierung benutzt wird, Glycerin zufügt. Die Tiefkühlung von Sperma wurde von P o l g e und R o w s o n versucht und durchgeführt in einer Weise, die dann nach den jeweils neuesten Erkenntnissen aber im Großen und Ganzen unverändert von anderen Autoren fortgeführt wurde. Nach E i b l und Z o d e r (4) und E i b l, U r b a s c h e k und Z o d e r (5), die das Tiefgefrieren mit Bullensperma durchführten, sind dazu zwei Verdüner notwendig, die nacheinander zugesetzt werden. Der Puffer I enthält eine 2,5 %ige Na-Citrat-Lösung mit Eidotter im Verhältnis 100: 25. Der Puffer II enthält Citrat-Lösung und Glycerin im Verhältnis 100 : 16 mit der gleichen Menge Dotter wie bei Puffer I. Die endgültige Samenflüssigkeit mit Verdüner soll dann ca. 25 % Dotter und 8 % Glycerin enthalten.

Legt man jedoch die obenangeführten Verhältniszahlen zugrunde, so ergeben sich tatsächlich andere Prozentzahlen, nämlich 18,7 % Dotter und 6,01 % Glycerin.

Dieselben Autoren, nämlich E i b l und Z o d e r, hatten vor den obenangeführten Verdünnern andere Puffer benutzt und zwar: Puffer I: Citrat : Dotter = 1 : 1, damit Verdünnung im Verhältnis 1 : 10 bis 1 : 3 je nach Dichte des Ejakulates. Puffer II: 15 bis 20 %ige Glycerin-Citrat-Lösung. Dabei wurde so viel Glycerin-Citrat zugegeben wie die Menge des bereits vorhandenen Gemisches aus Samen und Puffer I betrug.

Bei allen Verdünnungsversuchen stellte es sich heraus, daß es genau genommen für das Sperma jedes Bullen eine optimale Glycerinkonzentration und eine optimale Kühlgeschwindigkeit für die Tiefkühlung gibt. Überhaupt erfordert die Behandlung mit Glycerin und die anschließende Tiefkühlung ein besonders gesundes Sperma von großer Resistenz. S h e r m a n (30) berichtete nach Versuchen an menschlichem Sperma, daß das Einfrieren nach

vorheriger Zufügung von Glycerin besser überlebt wurde. Es hätte sich dabei nur extrazelluläres Eis gebildet, welches die Spermien nicht zu beeinträchtigen schien. Intrazelluläre Eiskristalle sah S h e r m a n nicht. Seiner Ansicht nach kommen unter der Einwirkung des Glycerins abgestumpftere Ecken an den Eiskristallen zustande.

R o w s o n (25) entschied sich dafür, daß der Zusatz eines glyzerinenthaltenden Verdünners zum Bullensperma bald nach der Samenentnahme erfolgen solle.

Die Frage, ob der Glycerinzusatz auf einmal oder fraktioniert hinzuzufügen sei, beantwortete J a k o b s e n (15) dahingehend, daß er bei Glycerinzusatz auf einmal bessere Resultate erhielt.

Bei seinen Versuchen mit Bullensperma kam P o l g e (23) zu dem Schluß, daß der Glycerinzusatz keinen schlechten Einfluß auf die Fruchtbarkeit des Spermas habe.

H o l t (13 und 24) wies an Hand von Vergleichen nach, daß der Befruchtungserfolg nach Zusatz von Glycerin sogar besser gewesen sei.

Eigene Versuche

Wichtig für die Verwendbarkeit des Glycerins als Gefrierschutzmittel ist also die Frage nach der Verträglichkeit, im Zusammenhang damit die Frage nach der besten Konzentration und nach der besten Art der Zufügung. Dabei kann, da die Frage zunächst nur der Verträglichkeit des Glycerins für das Sperma überhaupt gilt, die für die Tiefkühlung beste Konzentration fürs erste außer Acht gelassen werden. Zur Feststellung der Glycerinverträglichkeit, bzw. einer optimalen Konzentration wurden 35 Verdünnungen vorgenommen. Als Verdünner wurde der 3%ige Na-Citrat-Puffer, der 10% Dotter enthielt, verwendet. (Natrium citricum neutrale puriss.; $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 + 5,5 \text{ H}_2\text{O}$; Mol.-Gew. 294,12.) Dem Puffer wurde dann Glycerin zugesetzt in der Menge, die die jeweils gewünschte Konzentration ergab. Der Verdünner mit Glycerinzusatz wurde bei diesen Versuchen dem Sperma sofort nach der Gewinnung zugefügt, nachdem er im Wasserbad mit dem Sperma auf die gleiche Temperatur von $+25^\circ\text{C}$ gebracht worden war. Zu den Vergleichen wurden Glycerinkonzentrationen von 2%, 4%, 6% u.s.w. bis 20% herangezogen (Übersicht XIX). Bei diesen Versuchen zeigte es sich, daß die Zufügung von

glyzerinenthaltenden Verdünnern zum Sperma die Spermien in ihrer Lebensintensität nicht zu beeinträchtigen scheint, so lange sich die Glycerinkonzentration in bestimmten Grenzen hält. Innerhalb dieser Grenzen war die Bewegungsintensität und war die Lebensdauer im Vergleich zu Verdünnungen ohne Glycerinzusatz nicht verändert. Konzentrationen, die höher waren als 12 %, übten eine augenfällig ungünstige Wirkung aus. (Siehe Übersicht XIX). Gleichbleibend waren die Ergebnisse hinsichtlich der Lebensdauer und der Beweglichkeit der Spermien bei Glycerinkonzentrationen von 2 % bis 8 %, während bei 10 % schon leichte Abweichungen im Sinne einer verringerten Lebensintensität in manchen Fällen zu beobachten waren, und bei 12 % diese Verringerung durchweg eintrat (siehe Übersicht XIX).

Übersicht XIX

Ejakular Nr.	Lebensdauer in Stunden bei den Konzentrationen									
	2%	4%	6%	8%	10%	12%	14%	16%	18%	20%
20	120	120	120						24	24
25				168	144		48	24		
35	240					192				
36	192		192			144				
	192		192			96				
37		264		240				96		
		240		240				96		
38				240	240	192				
43				240	240	144				
44				216	216	168				
46				216	196	144				

Im Hinblick auf die Glycerinverträglichkeit schlechthin kann man also nicht von einer optimalen Glycerinkonzentration sprechen, sondern es gibt eine Grenze, ein Maximum, bis zu dem der Zusatz von Glycerin im Puffer von den Spermien gut vertragen wird. Dieses Maximum scheint bei 10 % zu liegen.

Eine weitere Frage ist die, ob der Zusatz von Glyzerin sofort nach der Gewinnung und Temperaturangleichung zwischen Sperma und Verdünner erfolgen soll, oder ob zunächst nur ein Puffer ohne Glyzerin zugefügt werden und später dann ein solcher mit Glyzerin folgen soll. Die Versuche, die der Beantwortung dieser Frage galten, umfaßten jeweils eine Verdünnung ohne Glyzerin, eine solche mit Glyzerin bei sofortigem Zusatz und eine Verdünnung, der das Glyzerin erst später zugefügt wurde. Bei Letzterer wurde wie folgt verfahren:

1. Verdünnung des Spermas im Verhältnis 1 : 2 mit einem Na-Citrat-Dotter-Puffer (Zusammensetzung des Puffers: Na-Citrat 3, 0; Dotter 10, 0; Aq. dest. 87, 0).
2. Nach 1 bzw. 2 oder 5 Stunden bei einer Temperatur von +5°C Zufügung von zwei Teilen des glyzerinenthaltenden Puffers auf einmal (Zusammensetzung: Na-Citrat 3, 0; Dotter 10, 0; Glyzerin 10, 0; Aq. dest. 77, 0).

Die Endverdünnung entsprach dann einem Verhältnis von 1 : 4. Der aus beiden Puffern gebildete endgültige Verdünner hatte demzufolge auf 100 Teile folgende Zusammensetzung: Na-Citrat 3, 0; Dotter 10, 0; Glyzerin 5, 0; Aq. dest. 82, 0. Bei Versuchen mit Milchverdünnern kamen die folgenden Puffer zur Verwendung:

1. Milch 90, 0; Dotter 10, 0
2. Milch 80, 0; Dotter 10, 0; Glyzerin 10, 0.

Endgültige Zusammensetzung: Milch 85, 0; Dotter 10, 0; Glyzerin 5, 0.

Jede Vergleichsreihe bestand also aus obenangeführten drei nach Inhalt und Zusatzart verschiedenen Verdünnungen. Zehn solcher Reihen wurden angesetzt. Die Glyzerinkonzentration betrug bei allen 5 %. Als Ergebnis zeigte es sich, daß zwischen den Verdünnungen ohne Glyzerin und denen mit Glyzerin und zwar bei sofortigem Zusatz in der Lebensdauer und in der Bewegungsintensität kein Unterschied auftrat, während bei Zusatz des Glyzerinverdünners nach 1 bzw. 2 oder 5 Stunden ein deutlicher Abfall zu verzeichnen war. Die Ergebnisse der Vergleiche sind aus Übersicht XX ersichtlich.

Übersicht XX

	Ohne Glyzerinzusatz	Glyzerinzusatz	
		sofort	später
Durchschnittliche Lebensdauer in Tagen	10, 2	10, 3	8, 6

Der sofortige Glycerinzusatz war demnach der bessere. In 16 weiteren Vergleichen wurde untersucht, ob das Zufügen des Glycerinverdünners auf einmal zu bevorzugen sei oder aber der fraktionierte Zusatz. Beide Verfahren wurden angewandt sowohl bei sofortigem Glycerinzusatz als auch bei einem solchen nach 5 Stunden. Letzterer erfolgte bei $+5^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank. Der fraktionierte Zusatz des Glycerinverdünners wurde mit einer Tropfpipette vorgenommen. Wenn im Verhältnis 1 : 4 verdünnt werden sollte, wurden nach der Gewinnung des Spermas zunächst zu 0,2 ml Sperma 0,4 ml Verdünner zugesetzt, dann nach 5 Stunden 0,4 ml Glycerin enthaltender Verdünner und zwar 0,01 ml in der Minute. Das Ergebnis dieser Vergleiche ist in Übersicht XXI zusammengefaßt.

Übersicht XXI

Art der Glycerinzufügung	Durchschnittliche Lebensdauer in Tagen
somit, auf einmal	10,3
somit, fraktioniert	6
nach 5 Stunden, auf einmal	8,1
nach 5 Stunden, fraktioniert	3,7

Daraus ergibt sich, daß die fraktionierte Zufügung des glyzerinenthaltenden Verdünners einen schlechten Einfluß auf das Sperma hat. Nachteile des fraktionierten Zusatzes sind die Gefahr von Temperaturschwankungen, die zeitweise ungleiche Glycerinkonzentration in der Verdünnung und die Störung der ruhenden Spermien, die sich ja sonst bei einer Temperatur von $+5^{\circ}\text{C}$ im wesentlichen kaum noch bewegen.

Folgerungen aus den Versuchen zur Glycerinverträglichkeit.

Es hat sich mithin ergeben, daß eine optimale Glycerinkonzentration hinsichtlich der Glycerinverträglichkeit nicht festzustellen war. Allerdings gibt es ein Konzentrationsmaximum, das noch gut vertragen wurde, und das bei 10 % liegt. Der Zusatz des glyzerinenthaltenden Verdünners erfolgte am besten gleich nach der Gewinnung des Spermas und nach der Temperaturangleichung zwischen Sperma und Verdünner. Am günstigsten war es, wenn die Zufügung des Glycerinverdünners auf einmal und der gewünschten Konzentration entsprechend vorgenommen wurde.

DIE TIEFKÜHLUNG VON HUNDESPERMA

Literatur

Die Tiefkühlung als Konservierungsverfahren wird bei der Aufbewahrung des Bullenspermas zum Zwecke der künstlichen Besamung des Rindes schon verwandt, und es hat sich gezeigt, daß das Sperma auf diese Weise über Wochen, Monate, ja Jahre befruchtungsfähig zu halten ist. Die Entwicklung dieses Verfahrens ist vor allem englischen Forschern zu danken, wie Polge (23), Rowson und Polge (26), Parkes (22), Polge, Rowson, Stower, Holt, Bruce, Swanney, Moss (24). Grootenhuis (9) praktizierte und veröffentlichte in den Niederlanden auf diesem Gebiete, und in Deutschland waren es vor allem Eibl, Urbaschek und Zoder (4, 5), die ihre Erfahrungen auf diesem Gebiete beschrieben haben.

Wie bereits erwähnt, bedarf es eines Glycerinzusatzes, um ein Überleben der Spermien nach der Tiefkühlung überhaupt zu erreichen. Auf die Ansichten der Autoren über die Art und Weise des Glycerinzusatzes wurde auf den Seiten 44 und 45 bereits eingegangen.

Die Frage, ob eine Adaptionszeit einzuhalten ist, wird von den meisten Autoren bejaht, so von Eibl, Urbaschek und Zoder (4, 5), die eine achttündige Adaptionszeit befürworten. Diese Feststellungen beziehen sich auf Tiefkühlverfahren für Bullensperma. Sherman (30) dagegen, der mit menschlichem Sperma Versuche anstellte, sagt, daß es gleichgültig sei, ob das Einfrieren gleich nach dem Zufügen von Glycerin erfolgt, oder nach einer gewissen Einwirkungszeit. Der Prozentsatz der überlebenden Spermien bleibe gleich. Es überwiegt im Schrifttum die Ansicht, daß ein langsames Einfrieren besser sei, als es die Sturzkühlung ist. Bereits im Jahre 1953 stellten Rowson und Polge (26) fest, daß bei Spermien, die ein Jahr bei einer Temperatur von -79°C aufbewahrt worden waren, die volle Befruchtungsfähigkeit erhalten war. Im Verdünnser waren bei ihren Versuchen 10% Glycerin enthalten. Der Verdünnungsgrad betrug 1 : 4.

Eigene Versuche

Die Grenzen der Glycerinverträglichkeit hatten sich in den entsprechenden Versuchen herausgestellt. Hinsichtlich der optimalen Glycerinkonzentration im Zusammenhang mit der Tiefkühlung lag nun die Vermutung nahe, daß Verträglichkeit und Wirkung des Glycerins nicht identisch seien; daß vielmehr die Schutzwirkung des Glycerins von der Dosierung abhängig sein würde. Die

Versuche bestätigten die Richtigkeit dieser Annahme. Sie zeigten, daß es einer ganz bestimmten Glycerinkonzentration, der optimalen Konzentration, bedarf, um die Schutzwirkung des Glycerins eintreten zu lassen. Sie zeigten ferner, daß diese optimale Konzentration bei den Hunden individuell verschieden ist, wenn diese Verschiedenheit sich auch in bestimmten Grenzen hält, und daß die Wirkung des Glycerins nie so ist, daß alle Spermien die Tiefkühlung überleben. Letzteres weist darauf hin, daß nur gesunde, ungeschädigte und ungeschwächte Spermien den schweren Eingriff der Tiefkühlung unter dem Schutze des Glycerins überleben können. Überdies stellte es sich unter der Wirkung der tiefen Temperaturen heraus, daß die Grenze der guten Glycerinverträglichkeit offenbar doch tiefer liegt, als es bei den entsprechenden Versuchen ohne Tiefkühlung zunächst den Anschein hatte. Denn wenn unterhalb einer gewissen Glycerinkonzentration der Untergang der Spermien auf die Wirkung der tiefen Temperaturen bei ungenügendem Glycerinschutz zurückzuführen ist, so werden oberhalb der optimalen Konzentration die Unverträglichkeit des Glycerins und die tiefen Temperaturen zusammenwirkend die Glycerinschutzwirkung ausschalten oder mindern.

Die Versuche an 42 Ejakulaten zur Ermittlung der optimalen Konzentration ergaben, daß diese zwar, wie gesagt, individuell verschieden ist, im übrigen aber um 6,5 % liegt. Sie wurden ausgeführt mit einem 3%igen Na-Citrat-Puffer, der 10 % Dotter enthielt, und der jeweils zu überprüfenden Glycerinkonzentration. Dem Sperma wurde der Verdüner sofort nach der Gewinnung und Temperaturangleichung im Verhältnis 1 : 4 zugesetzt. Die Tiefkühlung wurde im Anschluß an die Verdünnung vorgenommen, und zwar wurden die Proben zunächst im Kühlschrank auf +5°C abgekühlt mit einer Kühlgeschwindigkeit von 1°C in 2 Minuten, um dann von +5°C bis -79°C um 1°C in der Minute abgekühlt zu werden. Das Einfrieren erfolgte im Thermosgefäß im Alkoholbad durch Hinzufügen von Trockeneis. Die Proben wurden dann nach 1 bis 4 Tagen aufgetaut, indem sie in ein Wasserbad mit einer Temperatur von +38°C eingetaucht wurden, bis der Eiskern sich von der Wand der Gläschen löste. Das völlige Auftauen geschah in der Hand. Dann erfolgte die mikroskopische Untersuchung auf Beweglichkeit.

In der Übersicht XXII sind 7 Hunde aufgeführt, die für deren Sperma jeweils optimalen Glycerinkonzentrationen und der Anteil der sich vorwärtsbewegenden Spermien nach dem Auftauen in Prozenten.

Übersicht XXII

Hund	Optim. Glycerin- konzentration in %	Vorwärtsbewegung nach dem Auf- tauen in %	
		durchschnittlich	maximale
Astor	6,5	33,5	40
Jupp	6,0	32,5	35
Wolf	7,0	32,5	40
Rolf	6,0	28,7	30
Zappel	6,5	31,2	40
Lazarus	6,5	30,0	35
Strupp	6,5	21,2	35

Im Mittel erscheint also die Glycerinkonzentration von 6,5 % als die günstigste. Sie ist bei 7 Hunden viermal die optimale.

Mit dieser Konzentration als Basis für weitere Versuche wurde nunmehr entschieden, wie hoch der Dotteranteil zu bemessen sei. Dabei wurden 20 % Dotter als optimaler Anteil befunden. Hinsichtlich des Dotters fiel bei mehreren Versuchen auf, daß kräftig gefärbte Dotter bessere Ergebnisse erzielten, was wohl ihrem hohen Karotingehalt zuzuschreiben ist. Mit einem hellfarbigen Dotter war z.B. der Verdünner, der am 13.11.57 verwandt wurde, angesetzt. Am 13.11. und am 5.11. waren es dieselben Rüden, die das Sperma zu den Versuchen lieferten. An ihrer Haltung und Fütterung hatte sich nichts geändert. Trotzdem waren die Versuchsergebnisse vom 13.11. wesentlich schlechter als die vom 5.11. Ein Ei, das stark nach Fischmehl roch, übte in dem mit ihm angesetzten Verdünner einen derartig schlechten Einfluß auf das Sperma aus, daß der ganze Versuch hinsichtlich der Konservierung als mißlungen bezeichnet werden mußte.

Obwohl es sich in den Versuchen über die Glycerinverträglichkeit herausgestellt hatte, daß die Zufügung des glyzerinenthaltenden Verdünners auf einmal und sofort nach der Gewinnung des Spermas am günstigsten verlief (siehe Seite 42/43. Übersichten XX und XXI), wurden auch die anderen Verfahren nunmehr im Zusammenhang mit der Tiefkühlung nochmals einer Überprüfung unterzogen. Es wurden mit 21 Ejakulaten folgende Vergleiche angestellt:

1. Glycerinanteil 6,5 %. Zufügung sofort und auf einmal bei +25°C.
2. Glycerinanteil 6,5 %. Zufügung nach 5 Stunden und auf einmal bei +5°C.
3. Glycerinanteil 6,5 %. Zufügung sofort und fraktioniert bei +25°C.
4. Glycerinanteil 6,5 %. Zufügung nach 5 Stunden und fraktioniert bei +5°C.

Das Einfrieren erfolgte sofort nach dem Glycerinzusatz in der auf Seite 45 beschriebenen Weise, ebenso das Auftauen. Die Entscheidung fiel auch hier zugunsten der sofortigen Zufügung auf einmal aus. Im einzelnen erzielten die obenangeführten Methoden der Zufügung des Glycerinverdünners die in Übersicht XXIII aufgeführten Ergebnisse.

Übersicht XXII

	Vorwärtsbewegung in % nach dem Auftauen	
	durchschnittlich	maximal
Zusatz sofort auf einmal	28,1	40
Zusatz sofort fraktioniert	17,1	25
Zusatz später auf einmal	24,2	35
Zusatz später fraktioniert	10,2	15

Ob vor der Tiefkühlung eine Adaptionszeit mit Rücksicht auf den Glycerinzusatz einzuhalten ist, wurde in weiteren Versuchen an 21 Ejakulaten entschieden. Die einzelnen Ejakulate wurden nach folgenden Methoden in dieser Richtung überprüft.

1. Tiefkühlung sofort nach der Verdünnung.
2. Tiefkühlung 2 Stunden nach der Verdünnung.
3. Tiefkühlung 5 Stunden nach der Verdünnung.
4. Tiefkühlung 8 Stunden nach der Verdünnung

5. Tiefkühlung 10 Stunden nach der Verdünnung.

Die Kühlgeschwindigkeit betrug 1°C pro Minute, die Glycerinkonzentration 6,5 % bei allen Proben. Der Glycerinzusatz war im Verdünner enthalten. Die Verdünnung erfolgte im Verhältnis 1:4 und wurde sofort nach der Gewinnung und Temperaturangleichung vorgenommen, und zwar auf einmal. Einfrieren und Auftauen geschah wie auf Seite 53 beschrieben. Es kam dabei zu folgenden Ergebnissen (siehe Übersichten XXIV und XXV):

Übersicht XXIV

Dauer der Adaptionszeit	Vorwärtsbewegung n. d. Auftauen in %	
	durchschnittlich	maximal
ohne	26,9	40
2 Stunden	22,8	35
5 Stunden	22,6	35
8 Stunden	17,3	25
10 Stunden	16,6	30

Übersicht XXI

Dauer der Adaptionszeit	Vorkommen folgender Prozentsätze an Vorwärtsbewegung bei 21 Versuchen als Maxima		
	40 %	35 %	30 %
ohne	2 mal	1 mal	7 mal
2 Stunden	-	2 mal	4 mal
5 Stunden	-	3 mal	3 mal
8 Stunden	-	-	-
10 Stunden	-	-	1 mal

Es zeigte sich also, daß das Einfrieren nach Einhalten einer Adaptionszeit beim Hundesperma keine günstigere Wirkung hatte als die sofortige Tiefkühlung. Letzteres Verfahren erwies sich im Gegenteil als überlegen. Je früher die Kältestarre, d. h. also die Anabiose einsetzt, desto besser ist dies für die Spermien. Die Adaptionszeit gibt dem Sperma Zeit und Gelegenheit, sich zu erschöpfen und setzt es solcherart geschwächt den starken Noxen der Tiefkühlung aus. Der Verzicht auf die Adaptionszeit wird somit als die beste Lösung angesehen.

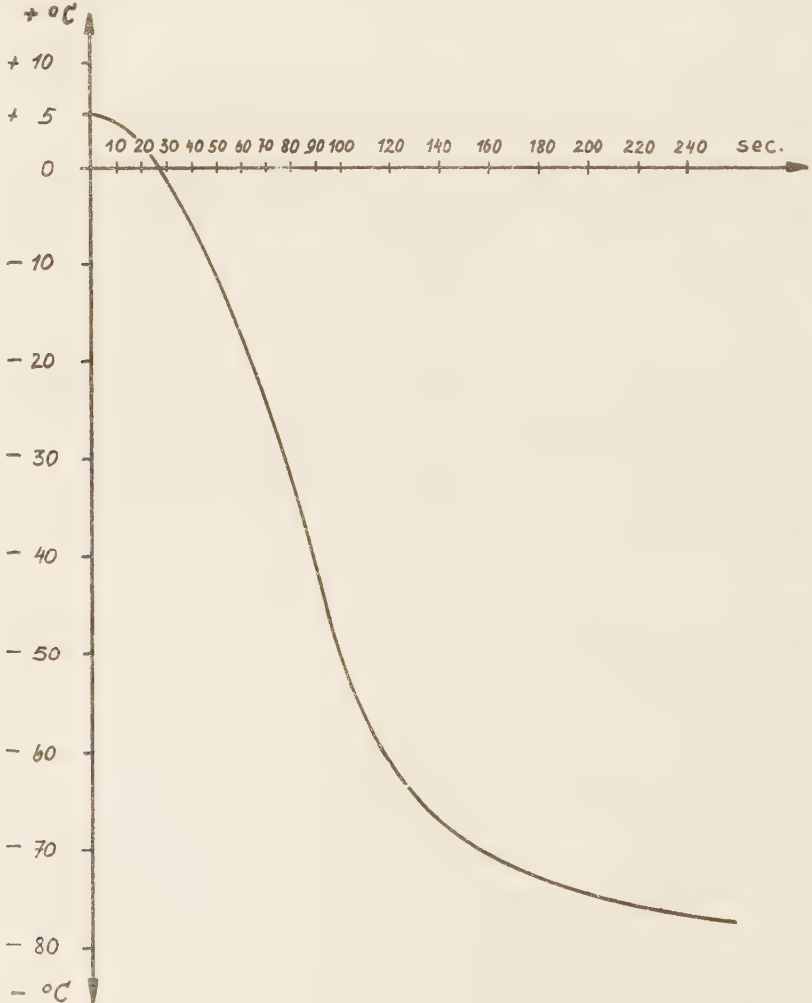
Zur Ermittlung der günstigsten Kühlgeschwindigkeit wurden bei 21 Ejakulaten im einzelnen folgende Vergleiche angestellt:

1. Kühlgeschwindigkeit 1°C pro Minute von $+5^{\circ}\text{C}$ bis -79°C .
2. Kühlgeschwindigkeit 1°C in 2 Minuten von $+5^{\circ}\text{C}$ bis -79°C .
3. Kühlgeschwindigkeit 2°C in der Minute von $+5^{\circ}\text{C}$ bis -79°C .
4. Sturzkühlung von $+5^{\circ}\text{C}$ bis -79°C .

Aus den Übersichten XXVI und XXVII geht hervor, daß die Sturzkühlung die besten Erfolge brachte, der höchstens die Tiefkühlung mit einer Kühlgeschwindigkeit von 1°C pro Minute nahek kommt. Es ist dann allerdings nicht notwendig die mühsamere langsame Abkühlung vorzunehmen (siehe Kurve auf Seite 50 und Übersichten XXVI und XXVII).

Die Sturzkühlung wurde folgendermaßen vorgenommen: Nach Verdünnung des Spermas und Abkühlung im Kühlschrank auf $+5^{\circ}\text{C}$ wurden die Samen-gläschen in ein Alkoholbad von -79°C verbracht. Die dabei beobachtete durchschnittliche Kühlgeschwindigkeit geht aus der Kurve hervor.

Kühlzeit in sec.	5	10	15	30	45	60	90	120	150	180	210	240
Grad C	+7	+7	+5	0	-7	-16	-44	-63	-71	-75	-78	-79



Übersicht XXVI

Kühlgeschwindigkeit	Vorwärtsbewegung nach dem	
	durchschnittlich	Auftauen in % maximal
1°C/min	28,8	40
1°C/2 min	24,2	35
2°C/min	8,3	25
Sturzkühlung	30,2	40

Übersicht XXVII

Kühlgeschwindigkeit	Vorkommen folgender Prozentsätze an Vorwärtsbewegung bei 21 Versuchen als Maxima		
	40%	35%	30%
1°C/min	3 mal	5 mal	4 mal
1°C/2 min	-	2 mal	4 mal
2°C/min	-	-	-
Sturzkühlung	4 mal	4 mal	7 mal

Da aus der Literatur zu entnehmen ist, daß es für das Sperma einzelner Bullen individuelle optimale Kühlgeschwindigkeiten gibt, wurden 7 Hunde daraufhin überprüft. Weil es sich jedoch in den vorhergehenden Versuchen gezeigt hatte, daß nur bei der Kühlgeschwindigkeit von 1°C pro Minute und der Sturzkühlung Zweifel darüber bestehen können, welches das bessere Verfahren sei, wurden nur für diese beiden Methoden Vergleiche angestellt. Unter 7 Hunden war dabei die Sturzkühlung einmal absolut und einmal eindeutig die beste Methode; dreimal war sie der Kühlgeschwindigkeit von 1°C/min um ein geringes überlegen und zweimal letzterer ebenso geringfügig unterlegen. Im Durchschnitt standen sich Sturzkühlung und Kühlgeschwindigkeit 1°C/min als Inhaber der Spitze im Verhältnis 2,7 : 1,8 gegenüber. (Siehe auch Übersicht XXVIII).

Übersicht XXVIII

Hund	Beste Kühlmethoden im Verhältnis zueinander Sturzkühlung : Kühlgeschwindigkeit $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ =
Astor	2 : 3
Jupp	3 : 2
Wolf	3 : 1
Rolf	3 : 0
Zappel	2 : 3
Lazarus	3 : 2
Strupp	3 : 2

Bei 10 Ejakulaten wurde die absolute Lebensdauer der Spermien nach dem Auftauen beobachtet. Sie betrug im Durchschnitt 72 Stunden, maximal 96 Stunden.

Besondere Beachtung verlangt ferner die Methode des Auftauens, denn sie ist von Einfluß auf das Überleben der Spermien nach der Tiefkühlung. Wenn beim Einfrieren die Änderung der Konzentrationen eine Gefahr für die Spermien bildet, so ist dies beim Auftauen ebenso der Fall. Auf folgende Arten wurde aufgetaut:

1. Eintauchen in ein Wasserbad mit einer Temperatur von $+38^{\circ}\text{C}$ bis zum gänzlichen Auftauen.
2. Eintauchen in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 38°C bis der Eiskern sich von der Wand des Gläschens löst, dann endgültiges Auftauen in der Hand.
3. Auftauen unter laufendem, kaltem Leitungswasser.
4. Auftauen in Eiswasser von $+1^{\circ}\text{C}$.

Die besten Ergebnisse erbrachte das unter 2. geschilderte Auftauen, das ja auch bei den Versuchen allgemein angewandt wurde.

Überblick über die Tiefkühlversuche

Die Tiefkühlversuche ergeben somit folgendes Bild:

Es gibt für die Tiefkühlung eine optimale Glycerinkonzentration. Diese ist bei den Hunden individuell verschieden. Sie liegt jedoch bei allen Versuchen zwischen 6 % und 7 %. Die Konzentration von 6,5 % wurde als optimale Konzentration allen weiteren Versuchen zugrunde gelegt und stellt nicht nur mathematisch die Mitte zwischen 6 % und 7 % dar, sondern kommt auch am häufigsten vor.

Ein Dotteranteil von 20% im Verdünner wird als der optimale angesehen. Kräftig gefärbte Dotter werden erfahrungsgemäß bevorzugt, Dotter von Eiern stark mit Fischmehl gefütterter Hühner werden als untauglich angesehen.

Der Glycerinzusatz soll auf einmal und der vollen beabsichtigten Konzentration entsprechend vorgenommen werden. Er findet statt sofort nach der Sperrmagewinnung und nach der Temperaturangleichung zwischen Sperma und Verdünner im Wasserbad bei +25°C.

Setzt die Tiefkühlung sofort nach der Verdünnung und somit auch sofort nach der Glycerinzufügung ein - lediglich nach Abkühlung auf +5°C im Kühlschränk (1°C/ 2 min) - , so sind die Ergebnisse besser als nach Einhalten einer Adaptionzeit.

Die Sturzkühlung erscheint als die beste Tiefkühlmethode. Dieses vor allem deshalb, weil sie einfacher ist als die mit einer Kühlgeschwindigkeit von 1°C pro Minute, die ihr an sich an Leistungsfähigkeit kaum nachsteht. Es gibt allerdings Hunde, deren Sperma die Sturzkühlung eindeutig besser überlebt als die langsame Abkühlung.

Das Auftauen erfolgt am besten im Wasserbad bei einer Temperatur von +38°C bis zum Lösen des Eiskernes von der Wand. Das endgültige Auftauen geschieht durch Handwärme.

ANREICHERUNG DES VERDÜNNERS

MIT KOHLENDIOXYD

Allgemeines und Literatur

Daß man sich noch einmal die Möglichkeit vor Augen, die für die Konservierung von Hundesperma gegeben sind, so sind es zwei Methoden, deren man sich zu bedienen vermag.

Die eine ist die Konservierung mit Hilfe von entsprechend zusammengesetzten Puffern. Wie dargelegt wurde, liegt ihre Schwäche darin, daß durch die Unterbrechung des Stoffwechsels die Lebenskraft der Spermien stark in Anspruch genommen wird und überdies das Medium in ungünstiger Weise verändert wird. Der Erfolg dieser Methode muß mithin schon zeitlich sehr begrenzt sein.

Der andere Weg ist der, der zur Herabsetzung des Stoffwechsels auf ein Minimum führt, und die Spermien im Zustand der Anabiose ruhen läßt. Das wird erreicht durch die Tiefkühlung. Deren Gefahren sind genannt worden. Ihr Vorteil liegt darin begründet, daß eine Erschöpfung der Spermien vermieden werden kann, und der minimale Stoffwechsel das Medium erst nach längerer Zeit erheblich ungünstig beeinflusst. Nach Rowson (25) scheint die Grenze der Aufbewahrungszeit bei einer Temperatur von -79°C mit 6 bis 7 Jahren erreicht zu sein. Diese Grenze wird gesetzt durch Autointoxikation auf Grund der Tätigkeit von Enzymen.

Da aber der Eingriff, den die Tiefkühlung darstellt, sehr schwer ist, können ihm mit einiger Aussicht auf Überleben nur wirklich ungeschwächte Spermien standhalten. Eben darum aber ist auch die kleinste Zeitspanne, die Ansprüche an die Lebenskraft der Spermien stellt, eine entscheidende Belastung.

Ein Verfahren, das derartige Belastungen weitgehend ausschaltet, hat v a n d e M a r k (31) für das Bullensperma beschrieben. Nach seinen Angaben ist eine Aufbewahrung von Sperma bei Zimmertemperatur möglich, wenn der Puffer vorher mit Kohlendioxyd angereichert wurde. Die Anreicherung wird vorgenommen durch Einleiten von CO_2 in den Puffer, bis in demselben ein pH -Wert unter 6,35 erreicht ist. Die Samenpumpen müssen dann vor Licht geschützt bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

Eigene Versuche

Übereinstimmend mit den Versuchen von de Marks konnte beobachtet werden, daß die Kohlensäure eine Inaktivierung der Spermien bewirkt. Deren Bewegungen hören auf, und sie sammeln sich recht bald als Bodensatz am Grunde der Ampulle an. Je eher die Verdünnung mit dem CO_2 -haltigen Puffer der Spermagewinnung folgt, desto kürzer ist für die Spermien die Zeitspanne, in der sie sich bewegen und somit auch erschöpfen können. Will man eine Ampulle öffnen, um Inhalt zu entnehmen, so empfiehlt es sich, diesen vorher gut durchzumischen. Untersucht man sofort nach dem Öffnen unter dem Mikroskop, so hat man ein Bild absoluter Starre vor Augen. Bei mehreren Versuchen wurde die Zeit gemessen, die vom Aufbringen auf den Objektträger bis zur größtmöglichen Beweglichkeit verstreicht. Der Objektträger lag dabei auf einem Heiztisch mit einer Temperatur von 38°C bis 40°C . Danach war nach 30 Sekunden noch keine Bewegung festzustellen. Diese setzte dann tie und da langsam ein, und nach 90 Sekunden konnten im allgemeinen bis zu 20 % sich vorwärtsbewegender Spermien beobachtet werden. Nach 270 Sekunden war das Optimum an Beweglichkeit erreicht.

Im Einzelnen wurden zur Überprüfung der Brauchbarkeit des CO_2 -enthaltenden Verdünners für die Konservierung von Hundesperma folgende Arten seiner Anwendung versucht:

1. Die von van de Mark beschriebene Methode, d.h. die Aufbewahrung bei Zimmertemperatur.
2. Die Aufbewahrung bei $+5^\circ\text{C}$ im Kühlschrank.
3. Die Tiefkühlung mit einer Kühlgeschwindigkeit von 1°C pro Minute.
4. Die Tiefkühlung durch Sturzkühlung.

Zunächst war der modus procedendi bei allen vier Methoden gleich. Beginnend mit der Vorbereitung des Verdünners wurde ein Puffer mit 3,0 Na-Citrat und 77,0 Aq. dest.* hergestellt. Sollte der Puffer bei tiefzukühlendem Sperma verwendet werden, so war seine Zusammensetzung Na-Citrat 3,0 + Glycerin 6,5 + Aq. dest. 70,5. In diesen Puffer wurde aus einer CO_2 -Druckflasche durch ein Reduzierventil Kohlendioxyd eingeleitet bis in der Flüssigkeit ein pH -Wert von 6,3 gemessen wurde. Das den Verdünner enthaltende Gefäß wurde dann geschlossen. In ein anderes, dessen Füllungsraum bekannt war, wurde so viel Dotter gegeben, daß später nach Zufügen des CO_2 -enthaltenden Puffers dieser 20% Dotter enthielt. Dann erfolgte Mischung von Dotter und Puffer und fester Verschuß des Gefäßes. Der CO_2 -enthaltende Verdünner wurde dem Sperma sofort nach der Gewinnung und Temperaturangleichung bei 28°C bis

30°C zugesetzt. Das Abfüllen der fertigen Verdünnung ging bei Zimmertemperatur vor sich. Vorher wurde CO₂ in die noch leeren Ampullen eingeleitet, um nach dem Zuschmelzen die Gefahr des Absinkens der CO₂-Konzentration durch Entweichen der Kohlensäure in den Raum über der Flüssigkeit zu verringern. Nach dem Zuschmelzen der Ampullen setzte dann die verschiedene Behandlung der Proben ein, wie sie oben unter 1 bis 4 aufgeführt wurde. Da die Konservierungsmethoden einschließlich der Tiefkühlung schon ausführlich besprochen worden sind, erübrigt sich hiermit eine weitere Darstellung derselben.

Bei der Überprüfung der Proben, die bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden waren, schien es, daß diese Art der Aufbewahrung für den Eidotter nicht günstig ist. Nach dem Öffnen der Ampullen war durchweg ein unangenehmer Geruch festzustellen, der bei den tiefgekühlten Ampullen nicht auftrat, obgleich deren Inhalt Teile des gleichen Dotters enthielt. Vor allem war auch hier wieder Fischnehlgeruch in besonders penetranter Weise festzustellen. Die Aufbewahrung von mit CO₂ angereicherten Spermaverdünnungen bei Zimmertemperatur dürfte sich selbst bei Verwendung besten und frischesten Dotters nur über Zeiträume empfehlen, die eine Woche nicht überschreiten. Diese Art der Aufbewahrung von Sperma hatte Ergebnisse die in Übersicht XXIX aufgeführt sind. Die Vorwärtsbewegung ist dabei ausgedrückt in Prozenten. Die eingeklammerten Zahlen geben die Dauer der Aufbewahrung in Tagen bis zum Öffnen der Ampullen an.

Wurden die Proben bei +5°C im Kühlschrank aufbewahrt, so waren die oben geschilderten Wahrnehmungen hinsichtlich des Geruches wesentlich geringer. Während bei der bei Zimmertemperatur aufbewahrten Versuchsreihe der Einfluß von Eigelb minderer Qualität deutlich hervortrat, war das dank der Kühlschranktemperatur nicht in diesem Masse der Fall, obgleich derselbe Verdünnner verwandt wurde. Die Ergebnisse hierzu sind ebenfalls aus Übersicht XXIX ersichtlich.

Übersicht XXIX

Ejakulat Nr.	Vorwärtsbewegung nach Aufbewahrung bei			
	Zimmertemperatur		+ 5°C	
122	70	(3)	60	(6)
123	60	(5)	60	(6)
124	60	(6)	50	(6)
125	50	(6)	30	(6)
126	40	(6)	50	(6)
127	40	(6)	50	(6)
128	40	(6)	60	(6)
129	60	(3)	60	(4)
130	50	(3)	70	(4)
131	20	(4)	60	(4)
132	10	(4)	60	(4)
133	-	(4)	50	(4)
134	-	(4)	50	(4)

Die Ergebnisse der Tiefkühlung sind in Übersicht XXX aufgeführt. Die Zahlen in dieser Übersicht geben die Vorwärtsbewegung nach dem Auftauen in Prozenten an bei der jeweiligen Tiefkühlmethode.

Übersicht XXX

Ejakulat Nr.	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
Kühl- geschw. 1°C/min	40	30	40	40	30	35	35	40	40	35	40	30	35
Sturz- kühlung	5	30	30	5	20	30	25	30	30	15	20	5	10

Dabei fällt auf, daß hier die Sturzkühlung eine ungleich schlechtere und vor allem sehr unterschiedliche Wirkung im Vergleich zur Tiefkühlung mit einer Kühlgeschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ hat.

Überblick über die Versuche mit CO_2 -Anreicherung.

Auf Grund dieser Versuchsergebnisse läßt sich sagen, daß die Aufbewahrung von Hundesperma, dessen Verdünner mit CO_2 angereichert worden ist, über einige Tage aber nicht länger als eine Woche bei Zimmertemperatur gut möglich ist.

Bessere Ergebnisse erhält man durch die Aufbewahrung bei -5°C im Kühlschrank.

Das Tiefgefrieren durch Sturzkühlung ist unsicher.

Für eine Konservierung auf längere Zeit kann die Tiefkühlung mit einer Kühlgeschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ in Verbindung mit der CO_2 -Anreicherung des Puffers empfohlen werden.

ÜBERBLICK ÜBER DAS GESAMTE ARBEITSGEBIET

Es wurden Untersuchungen durchgeführt, die sich auf verschiedene Konservierungsmethoden für Hundesperma erstreckten, angefangen bei der Konservierung mit Hilfe von Puffern und Verdünnern über die Tiefkühlung bis zur Verwendung von mit Kohlendioxyd angereicherten Puffern und auch dieses in Verbindung mit der Tiefkühlung.

Da lediglich die zweite Phase des Hundeejakulates zur Konservierung tauglich ist, weil nur sie die Spermien enthält, wurde die Spermaentnahme mit einer künstlichen Vagina vorgenommen, die mit einem Pulsator versehen und deren Samenauffangglas leicht zu entfernen bzw. auszuwechseln war. Vor dem dreiphasischen Ejakulat des Hundes wurde nur die zweite Phase zur Auswertung im Versuch herangezogen. Verschiedene Puffer wurden in ihrer Wirksamkeit miteinander verglichen, nachdem im Experiment ihre optimale Konzentration festgestellt worden war. Die Verdünnung des Spermas wurde im Verhältnis 1:4 vorgenommen. Dies geschah sofort nach der Samenentnahme, nachdem die Temperaturen von Sperma und Verdünner im Wasserbad auf +25°C gebracht worden waren. Nach der Verdünnung erfolgte Abkühlung um 1°C in 2 Minuten bis auf +5°C und Aufbewahrung im Kühlschrank. Die besten Verdünnner sind hier nach ihrer Leistung geordnet und unter Angabe der Zusammensetzung genannt.

1. Magermilch-Dotter: Magermilchpulver 10,0; Aq. dest. 100,0; Dotter 10,0.
2. Magermilch: Magermilchpulver 10,0; Aq. dest. 100,0.
3. Magermilch-Dotter-Na-Citrat: Magermilchpulver 10,0;
Aq. dest. 100,0; Dotter 10,0; Na-Citrat 3,7;
(das sind 3 % Na-Citrat im Verdünner).
4. Na-Citrat - Dotter: Na-Citrat 3,0; Dotter 10,0; Aq. dest. 87,0.
5. Na-Phosphat-Dotter: Na-Phosphat 3,5; Dotter 10,0; Aq. dest. 86,5.
6. Fruktose-Glycin-Dotter: Fruktose 5,0; Glycin 3,0; Dotter 10,0;
Aq. dest. 82,0.

Der beste Verdünner verhalf dem Sperma zu einer absoluten Lebensdauer von durchschnittlich 303,2 Stunden, maximal 336 Stunden. Nach 8 Tagen zeigten

im Durchschnitt 44,5 % der Spermien noch Vorwärtsbewegung, maximal 60 %.

Die Glycerinverträglichkeit bei Hundesperma kennt keine optimale Glycerinkonzentration, wohl aber eine obere Grenze der guten Verträglichkeit. Im Zusammenhang mit der Tiefkühlung gibt es allerdings eine optimale Konzentration. Diese wäre zu definieren als derjenige im Verdünner enthaltende Glycerinanteil, der bei guter Verträglichkeit - also Unschädlichkeit - die beste Schutzwirkung den Gefrierschäden gegenüber hat. Es zeigte sich, daß dieses Optimum bei den Hunden individuell verschieden war. Es lag jedoch immer zwischen 6 % und 7 %, vorwiegend bei 6,5 %. Zur Tiefkühlung von Hundesperma wurde der Na-Citrat-Dotter-Puffer verwandt mit 6,5 % Glycerin (Na-Citrat 3,0; Glycerin 6,5; Dotter 20,0; Aq. dest. 70,5). Dieser, die volle beabsichtigte Glycerinkonzentration enthaltende Puffer wurde dem Sperma alsbald nach der Gewinnung und nach erfolgter Temperaturangleichung zugesetzt und zwar auf einmal, so daß ein Verdünnungsgrad von 1 : 4 entstand. Diese Art des Glycerinzusatzes hatte sich dem Verfahren der fraktionierten Zufügung oder des zeitlich getrennten Zusatzes von Verdünnern ohne und mit Glycerin überlegen gezeigt. Im Anschluß an die Verdünnung erfolgte langsame Abkühlung auf +5°C und dann begann sofort die Tiefkühlung. Im Gegensatz zu diesem Verfahren hatte sich das Einhalten einer Adaptionzeit als ungünstiger erwiesen. Hinsichtlich der Kühlgeschwindigkeit wurden die besten Erfolge mit einer solchen von 1°C/min und mit der Sturzkühlung erzielt. Beide Verfahren wurden als etwa gleichwertig beurteilt, wobei der Sturzkühlung dann deshalb der Vorzug gegeben wurde, weil sie einfacher zu handhaben ist. Im übrigen zeigte es sich, daß es auch hinsichtlich der Bevorzugung einer Kühlgeschwindigkeit individuelle Unterschiede bei den Spermata einzelner Hunde gibt. Bei 21 Ejakulaten war die Vorwärtsbewegung nach dem Auftauen im Anschluß an das Einfrieren mit einer Kühlgeschwindigkeit von 1°C/min im Durchschnitt 28,8%, nach Sturzkühlung 30,2 %, maximal bei beiden 40 %.

Zum Auftauen wurden die Ampullen zunächst in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 38°C bis 40°C geschwenkt bis zur Lösung des Eiskerns von der Wand. Das völlige Auftauen geschah in der Hand.

Um die Spermien nach der Ejakulation möglichst schnell zu inaktivieren, wurden Versuche mit einem Puffer gemacht, der mit CO₂ angereichert worden war. Hierzu wurde der Na-Citrat-Dotter-Puffer benutzt, in den Kohlendioxyd eingeleitet wurde bis ein p_H-Wert von 6,3 im Verdünner erreicht war. Dieser Verdünner wurde dem Sperma sofort nach der Temperaturangleichung zugesetzt.

Derartig behandeltes Sperma konnte sowohl bei Zimmertemperatur als auch im Kühlschrank bei $+5^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden, wobei die letztgenannte Art der Aufbewahrung mit Rücksicht auf die Haltbarkeit des Dotteranteils im Verdünner bevorzugt wurde.

Auch die Tiefkühlung solcherart präparierter Spermaproben zeigte gute Ergebnisse. Dabei war das Resultat bei einer Kühlgeschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ besser und gleichmässiger als bei der Sturzkühlung.

Zeigten nach dem Auftauen von, Spermaproben, die mit gewöhnlichem Na-Citrat-Puffer präpariert waren durchschnittlich 28,8 % der Spermien Vorwärtsbewegung, so waren es bei mit CO_2 angereichertem Verdünner gleicher Art 36,1 % im Durchschnitt.

Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Vor allen anderen Puffern zeigte der Magermilch-Dotter-Verdünner die beste konservierende Wirkung.
2. Im Zusammenhang mit der Tiefkühlung beträgt die optimale Glyzerinkonzentration im Na-Citrat-Puffer 6,5 %. Der diesen Glyzerinanteil enthaltende Verdünner wurde dem Sperma alsbald nach der Gewinnung und auf einmal zugefügt.
3. Hinsichtlich ihrer Erfolge sind die Tiefkühlung mit einer Kühlgeschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ und die Sturzkühlung als gleichwertig zu betrachten. Letztere verdient als einfacheres Verfahren den Vorzug.
4. Durch Anreicherung mit Kohlendioxyd wird die Wirkung des Na-Citrat-Puffers verbessert.
5. Die Tiefkühlung zeigte bei einer Kühlgeschwindigkeit von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bessere Resultate, wenn der Puffer mit CO_2 angereichert worden war.

Die Versuche haben gezeigt, daß eine langdauernde Aufbewahrung von der möglichst frühzeitigen Anabiose der Spermien abhängt. Die Voraussetzung dafür scheint bei der Tiefkühlung von mit Kohlendioxyd angereicherten Spermaverdünnungen gegeben zu sein.

Es hat sich erwiesen, daß auf diese Weise das Leben der Spermien erhalten werden kann. Ob mit dem Leben auch die Befruchtungsfähigkeit erhalten bleibt, müssen weitere und entsprechende Versuche noch zeigen.

LITERATUR-VERZEICHNIS

1. Biedermann, H.: Gewinnung, Verdünnung und Beschaffenheit des Spermas beim Hund.
Diss. Hannover 1951
2. Brochard, M. -Coulomb, J.: Untersuchungen über Verdünnungen und Konservierung des Hundespermas.
Bull. l'Acad. Vet. 2559 (1952)
Ref. Vet. Med. H 2, 248 - 249 (1952)
3. Blackshaw, A. W.: Factors Affecting the Revival of Bull and Ram Spermatozoa after Freezing to -79°C .
Aust. Vet. Journal 31, 238-241 (1955)
Ref. Animal Breeding Abstracts 24, 151 (1956)
4. Eibl, K. - Zoder, H.F.: Zur Technik der Samenunterkühlung.
DtW. Sonderbeil. 5. Jahrg. Heft 8 (1955)
5. Eibl, K. -Urbaschek, B.
Zoder, H.F.: Tiefkühl-Konservierung des Bullenspermas.
DtW. Sonderbeil. 4. Jahrg. Heft 5 (1954)
6. Flipse, A.: Metabolism of Glycine by Bovine Spermatozoa.
Science 114 (1956)
7. Götze, R.: Spermagewinnung, Spermaprüfung und künstliche Besamung bei den Haustieren.
DtW. 1939
8. Götze, R.: Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugtiere. Verlag Schaper 1949
9. Grootenhuis, G.: Das Tiefgefrierverfahren zur Konservierung des Samens und seine Anwendung in der Praxis.
Tijdschr. Diergeneesk 78, 20 (1953)

10. Harrop, A.E.: A New Type of Canine Artificial Vagina.
The Brit. Vet. Journ. Vol. 110, No. 5,
pp. 194 - 196, May 1954
11. Harrop, A.E.: Some Observations on Canine Semen.
The Vet. Record 67, 494, June 1955
12. Harrop, A.E.: Artificial Insemination in Dogs.
The Brit. Vet. Journ. Vol. 112, No. 8,
pp. 338 - 340, Aug. 1956
13. Holt, A.F.: The Effect of Glycerolisation of Bull Semen
on Fertility.
The Vet. Rec. 1953, Vol. 65, No. 39.
14. Jahnel, J.: Agglutination von Spermatozoen im Na-Citrat-
Verdünner.
Wiener Tierärztl. Monatsschrift 41,
486 - 496 (1954)
15. Jakobsen, F.: Some Methods of Bull Semen Storage and
their Influence on Fertility Results. IIIrd.
Int. Congr. Animal Reprod., Cambridge.
Plenary Papers pp 30-32 (1956)
16. Kerruish, D.W.: A Field Trial Comparison of Milk an
Egg-Yolk-Citrate as Semen Dilutors.
IIIrd. Int. Congr. Animal Reprod., Cambridge.
Plenary Papers pp 65-68 (1956)
17. Leonard, E.P.: Artificial Insemination of Farm Animals.
Rutgers University Press (1952)
18. Leonard, E.P.: Pups by Trans-Atlantic Artificial Insemination.
The Newer Knowledge about Dogs.
Gaines Vet. Symposium Oct. 1956
19. Lindahl, P.E.: An Antiagglutinin Factor in Mammalian Sperm
Kihlström, J.E.: Plasm. Fertility and Sterility 5, 241 (1954)

20. Mann, T. -White, I.G.: Metabolism of Glycerol, Sorbitol and Related Compounds by Spermatozoa. Nature 178, 142, London 1956
21. Milowanow, V.K.: Die künstliche Befruchtung der Haustiere. Moskau 1940
22. Parkes, A.S.: Preservation of Living Cells and Tissues at low Temperatures. IIIrd. Int. Congr. Animal Reprod., Cambridge. Plenary Papers pp 69-75 (1956)
23. Polge, C.: The Storage of Bull Semen at Low Temperatures. The Vet. Rec. 1953 Vol. 65, No. 35
24. Polge, Rowson, Stower, Holt, Bruce, Swanney, Moss: Symposium: Society for the Study of Animal Breeding. Febr. 6th. 1953 The Vet. Rec. 1953, Vol. 65.
25. Rowson, L.E.A.: IIIrd. Int. Congr. Animal Reprod., Cambridge. Plenary Papers pp 69-75 (1956)
26. Rowson, L.E.A. -Polge, C.: Storage of Bull Semen at -79°C and Fertility Results for up to 12 Months. The Vet. Rec. 1953, Vol. 65, No. 43
27. Roy, A. -Bishop, M. W.H.: Effect of Glycine on the Survival of Bull-Spermatozoa in Vitro. Nature 174, 746-747 London 1954
28. Scheunert, A. -Trautmann, A.: Lehrbuch der Veterinärphysiologie. Verlag Paul Parey 1951
29. Shergin, I.A.: Preservation of Animal Spermatozoa. Proc. Lenin Acad. Agric. Ref. Science 21 (1956)
30. Shermann, J.K.: Freezing and Freez-Drying of Human Spermatozoa. Fertility and Sterility 5, 357 - 371 (1954)

31. Van de Mark: Vortrag über die Anreicherung von Puffern mit Kohlendioxyd, gehalten am 2. 5. 57.
Ref. The A. I. Digest.
June 1957. Vol. 5, No. 6.
32. Van Dieten, S. W.J.: Konservierung und Kühlung des Spermas.
DtW. Sonderbeil. 4. Jahrg. Heft 12 (1954)

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Baier, darf ich an dieser Stelle meinen Dank für die Überlassung des überaus interessanten Themas aussprechen. Ich habe weiterhin zu danken dem Vorstand der Chirurgischen Tierklinik der Universität München, Herrn Prof. Dr. Westhues und dem Vorstand der Medizinischen Tierklinik der Universität München, Herrn Prof. Dr. Ullrich für die freundliche Genehmigung, klinikeigene Hunde für die Versuche zu benutzen.

Desgleichen gilt mein Dank dem Privatdozenten an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München, Herrn Dr. Leidl für so manche wertvolle Anregung.

L E B E N S L A U F

Als Sohn des Kaufmanns Willy Bahlau und seiner Ehefrau Margarete Bahlau, geb. Rehwinkel, wurde ich, Eberhard Bahlau, am 19. Juni 1925 zu Berlin-Steglitz geboren. In Berlin-Tempelhof besuchte ich von 1936 bis 1939 das Askanische Gymnasium und dann von 1940 bis 1943 die Hindenburg-Oberschule in Posen, die ich im Februar 1943 mit dem Vorsemestervermerk verließ, um bis Kriegsende der Wehrmacht anzugehören. Von 1945 bis 1948 war ich in der Landwirtschaft tätig, zuletzt als Verwalter. Im Jahre 1949 legte ich auf dem Heimkehrerlehrgang in Adelheide bei Delmenhorst die Reifeprüfung ab. Während des Winter-Semesters 1949/50 und des Sommer-Semesters 1950 studierte ich an der Hochschule für Arbeit, Politik und Wirtschaft in Wilhelmshaven und vom Winter-Semester 1950/51 bis zum Winter-Semester 1951/52 an der Juristischen Fakultät der Universität München. Das tierärztliche Studium begann ich in Hannover und belegte dort das Winter-Semester 1952/53 und das Sommer-Semester 1953. Vom Winter-Semester 1953/54 bis zum Winter-Semester 1956/1957 studierte ich an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München und beschloß an dieser Fakultät am 22. Juli 1957 das Studium der Tiermedizin mit dem Staatsexamen.

